

Deonildo Faggion Junior

**Nanopartículas cúbicas de paládio aplicadas como
eletrocatalisadores para redução de oxigênio atmosférico,
integrados a uma célula híbrida a biocombustível de
glicose/oxigênio**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Química.

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor

Maiores informações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Deonildo Faggion Junior

Nanopartículas cúbicas de paládio aplicadas como eletrocatalisadores para redução de oxigênio atmosférico, integrados a uma célula híbrida a biocombustível de glicose/oxigênio

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina,

Florianópolis, 31 de março de 2017.

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.

Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Josiel B. Domingos, Dr.
Orientador (UFSC)

Prof.^a Kelly de Oliveira Santos,
Dr.^a
Relatora (IFB)

Prof. Henri Stephan Schrekker, Dr.
(UFRGS)

Prof. Ademir Neves, Dr.
(UFSC)

Prof. Ricardo José Nunes, Dr.
(UFSC)

Alex Molina Manfredi, Dr.
(UFSC)

Este trabalho é dedicado à Deonildo Faggion, meu pai, que partiu cedo, mas sempre esteve presente em minhas conquistas, e à minha mãe, Maria Aparecida, que sempre me apoia em todos os meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre me apoiou de todas as formas, e especialmente minha mãe, que sempre esteve ao meu lado. Às minhas irmãs e sobrinhos por tantos momentos de felicidade.

À Vivi, pelos momentos vividos com amor e paciência.

Ao Prof. Josiel Domingos pela orientação e confiança em uma trajetória de praticamente 10 anos.

Ao Prof. Serge Cosnier por me receber em seu grupo de pesquisa na França me proporcionando grandes experiências.

Ao Fabien Giroud, pelos ensinamentos e pela parceria em toda a minha estada na França, pois sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Noémie e a Fatima, minhas colegas de bureau e amigas, que dividi muitos momentos felizes.

Ao Marcos Mariano, por sua amizade e parceria em Grenoble.

Aos meus amigos Brunno e Eloah, por toda a ajuda e amizade incondicional.

Aos colegas do LaCBio, pelas conversas e incentivos.

Aos colegas do LabEqs, pelos momentos de descontração e longos cafés.

Aos professores e funcionários do departamento de química pelos conhecimentos e convivência.

À UFSC, CNPq, CAPES e FAPESC.

"Educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas. Pessoas
transformam o mundo."

Paulo Freire

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliada a atividade eletrocatalítica de nanopartículas cúbicas de paládio para a reação de redução de oxigênio (ORR) através da modificação de eletrodos de carbono vítreo (GC) e de eletrodos constituídos de uma camada de difusão de gás (GDL). Estes eletrodos foram então utilizados como cátodos para a confecção de uma célula híbrida a biocombustível por meio da sua combinação com um ânodo enzimático a base de glicose desidrogenase (GDH). As nanopartículas cúbicas de Pd (PdNPs) foram sintetizadas em quatro diferentes tamanhos, utilizando HCl para o controle do tamanho, em um processo de corrosão oxidativa ácida. Para a confecção dos eletrodos, as dispersões dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e das PdNPs foram depositadas camada sob camada em eletrodos de GC. Os diferentes tamanhos de nanopartículas sintetizadas foram reconhecidos quanto às suas capacidades de redução de oxigênio (potencial de início da redução e densidade de corrente eletrocatalítica) em condições saturadas de O₂. A reação de redução de oxigênio pelas PdNPs também foi determinada em uma ampla faixa de pH. Também foi demonstrada uma forte evidência no que diz respeito a limitação da difusão de O₂ na superfície do eletrodo modificado com as PdNPs. Para ultrapassar estas limitações de concentração e difusão de oxigênio em solução, utilizou-se a GDL com o objetivo de criar um cátodo a base das PdNPs que permitisse a redução de O₂ diretamente do ar atmosférico, como um cátodo respirante, que forneceu -1,5 mA cm⁻² em um potencial de 0,0 V com início da redução em 0,4 V. Este cátodo respirante foi então combinado com um ânodo a base de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ), utilizada como mediador redox e enzima GDH, especialmente concebido para formar uma célula a biocombustível híbrida de glicose/O₂ completa, proporcionando uma voltagem de circuito aberto (OCV) de 0,554 V e uma potência máxima de 184 ± 21 μW cm⁻² a 0,19 V em pH 7,0.

Palavras-chave: células híbridas a biocombustível, nanopartículas cúbicas, paládio.

ABSTRACT

In this work it was evaluated the electrocatalytic activity of palladium cubic nanoparticles for the oxygen reduction reaction (ORR) by the modification of glass carbon (GC) and gas diffusion layer (GDL) electrodes. These electrodes were then used as cathodes for the manufacture of a hybrid biofuel cell made by the combination with an enzymatic anode based on glucose dehydrogenase (GDH). The Pd cubic nanoparticles (PdNPs) were synthesized in four different sizes, using HCl for size control, in an acidic oxidative corrosion process. For the preparation of the electrodes, the multiwalled carbon nanotube (MWCNT) and the Pd cubic nanoparticles (PdNPs) dispersions were deposited onto glassy carbon electrodes layer-by-layer. The PdNPs of different sizes were investigated upon oxygen reduction capacities (onset potential and electrocatalytic current densities) under O₂ saturated conditions. The oxygen reduction reaction by the PdNPs were evaluated over a broad pH range. Strong evidence of O₂ diffusion limitation on the surface of the PdNPs modified electrode was demonstrated. In order to overcome the oxygen concentration and diffusion limitations in solution, a gas diffusion layer was used to create a PdNP-based air-breathing cathode, which delivered -1.5 mA cm^{-2} at the potential of 0.0 V with an onset potential of 0.4 V. This air-breathing cathode was combined with a specially designed phenanthrolinequinone/glucose dehydrogenase-based anode to form a complete glucose/O₂ hybrid bio-fuel cell providing an open circuit voltage (OCV) of 0.554 V and delivering a maximal power output of $184 \pm 21 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ at 0.19 V at pH 7.0.

Keywords: hybrid biofuel cell, cubic nanoparticles, palladium.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1. Nanopartículas Metálicas (M-NPs).....	3
2.1.1. Síntese de Nanopartículas Metálicas	6
2.1.2. Catálise por nanopartículas metálicas	10
2.1.3. Reação de redução de oxigênio por nanopartículas metálicas de Paládio	11
2.2. Células a biocombustíveis.....	12
2.3. Eletrodos enzimáticos (Redox) e a transferência de elétrons para o eletrodo	17
2.3.1. Modificação enzimática de eletrodos.	20
3. Objetivos	23
3.1. Metas	23
4. Parte Experimental	25
4.1. Reagentes e solventes	25
4.2. Materiais, equipamentos e técnicas.....	26
4.3. Síntese das Nanopartículas Cúbicas de Pd com tamanho controlado	27
4.4. Preparação dos cátodos com PdNP	29
4.5. Caracterização Eletroquímica dos cátodos com PdNP	30
4.6. Modificação dos MWCNTs com os mediadores redox	31
4.7. Preparação dos bioânodos bifuncionalizados modificados com GDH e PLQ	32
4.8. Caracterização Eletroquímica dos bioânodos modificados.....	33
4.9. Caracterização da Célula híbrida a biocombustível	34
5. Discussão dos Resultados	37
5.1. Caracterização das nanopartículas cúbicas de paládio	37

5.2. Caracterização morfológica e eletroquímica dos compósitos de PdNP/MWCNT	42
5.3. Estudo da Reação de Redução de Oxigênio pelos eletrodos de PdNP/MWCNT em diferentes valores de pH.	46
5.4. Verificação de formação de peróxido de hidrogênio como produto da redução de O ₂	47
5.5. Comparação da atividade catalítica dos diferentes tamanhos de PdNPs cúbicas na reação de redução de oxigênio.	49
5.6. Eletrodos de PdNPs/MWCNT preparados com GDL e variação da quantidade de Pd.....	52
5.7. Estabilidade dos eletrodos de GDL modificados com PdNPs/MWCNT	55
5.8. Construção e otimização do bioânodo utilizando GDH NAD-dependente	57
5.8.1. Investigação das possíveis reações paralelas no cátodo ...	66
5.9. Performance da célula híbrida a glicose/O ₂	69
6. Conclusões.....	73
7. Bibliografia	75
8. Anexos	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** : Estabilização (a) eletrostática, (b) estérica e (c) eletroestérica. ... 4
- Figura 2.** Modelos que ilustram as estruturas atômicas para nanocristais metálicos do tipo cúbico de face centrada em três formas distintas com diferentes arranjos atômicos em sua superfície. (a) Modelo atômico de um cuboctaedro contendo três camadas atômicas, evidenciando os diferentes tipos de átomos de superfície e seus números de coordenação (NC). (b) Modelos atômicos de nanopartículas cúbicas e octaédricas respectivamente. (c) Proporção dos diferentes tipos de átomos de superfície em função do tamanho das arestas para cuboctaedros de Au (adaptada da referência⁴⁵). ... 5
- Figura 3.** Efeito da difusão de superfície sobre o padrão de crescimento de uma semente cúbica de Pd. Esquemas de (A) três opções diferentes para a difusão dos átomos de Pd adicionados ao vértice de uma semente cúbica Pd cujas faces laterais são cobertas por íons Br⁻, e (B) diferentes vias e as formas correspondentes ou morfologias esperadas para o crescimento de uma semente cúbica de Pd em quatro condições diferentes. O tamanho dos íons Br⁻ foi reduzido em relação aos átomos de Pd para mostrar a estrutura da superfície de forma mais clara. (reproduzido da referência⁵⁵). 8
- Figura 4.** Comparação dos custos do Pd, Pt e Au por *troy ounce* em dólares, no período de 2000-2009, (adaptado da referência¹⁵). 13
- Figura 5.** Representação esquemática de uma célula a combustível enzimática (adaptada da referência⁶⁴). 14
- Figura 6.** (A) Simulação das curvas de polarização para o ânodo e cátodo e (B) Curva esquemática da polarização e perfil de potência de uma célula a combustível. (adaptada da referência⁶⁵). 15
- Figura 7.** Esquema da transferência de elétrons direta (DET) e mediada (MET) 19
- Figura 8.** Esquema sintético das nanopartículas cúbicas de paládio. 28
- Figura 9.** Esquema de preparado dos eletrodos modificados com MWCNT/PdNPs, sobre os eletrodos de carbono vítreo. 30
- Figura 10.** Esquema de preparado dos eletrodos de carbono vítreo a base de MWCNT modificados com mediadores redox. 31
- Figura 11.** Esquema do preparo da GDH modificada com grupo pireno (pir-GDH). 32
- Figura 12.** Esquema da bifuncionalização dos MWCNT com PLQ e pir-GDH, sobre a superfície dos eletrodos de carbono vítreo. 33

Figura 13. Esquema da célula de polimetilmetacrilato utilizado para a caracterização da célula híbrida a biocombustível. (para melhor visualização o esquema mostra a célula na posição invertida).....35

Figura 14. Imagens de TEM e respectivos histogramas dos nanocubos de paládio preparados na presença de diferentes concentrações de HCl: (A) 0, (B) 3,3, (C) 6,6 e (D) 11,0 mmol L⁻¹.38

Figura 15. Gráfico do tamanho médio das PdNPs cúbicas em função das concentrações de HCl utilizadas nas sínteses, com o devido ajuste linear ($R^2 = 0,9908$).39

Figura 16. Difratograma de XRPD experimental (linhas vermelhas), calculado (linhas pretas) e a diferença entre o experimental e calculado, das PdNPs, (a) 22,5 nm, (b) 19,1 nm, (c) 16,1 nm e (d) 12,1 nm.41

Figura 17. (a) Imagem de HRTEM e (b) Espectro de EDS HRTEM das PdNP de 12,1 ± 1,7 nm.....42

Figura 18. Imagem de SEM dos MWCNT (superior) e MWCNT com PdNPs (inferior). As imagens são referentes às mesmas áreas das amostras, utilizando diferentes modos de detecção, sendo (esquerda) no modo de detecção de elétrons secundários (*Everhart-Thorneley detector*; ETD) para a visualização em profundidade da camada de deposição dos MWCNT e (direita) utilizando modo de elétrons retroespalhados (*Circular Backscatter Detector*; CBS) para um melhor contraste da distribuição das PdNPs nos MWCNT.....43

Figura 19. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo modificados com PdNPs/MWCNT em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, a temperatura ambiente e saturado com Ar. Em uma janela eletroquímica restrita (tracejado) e estendida (linha), com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Estão representados apenas os terceiros ciclos de cada janela eletroquímica.44

Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo modificados com PdNPs/MWCNT em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, a temperatura ambiente e saturado com Ar em diferentes velocidades de varredura. *Inset*: I_{pc} vs. velocidade de varredura.....45

Figura 21. (A) Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio realizados utilizando eletrodos de GC modificados com PdNPs/MWCNT sob argônio em solução tampão de *Britton-Robinson* (pH 5,0) (linha pontilhada) e saturado com O₂ em diferentes valores de pH (linhas sólidas), com velocidades de varreduras de 10 mV s⁻¹. (B) Valores de potenciais de início do processo de redução (*onset*) (preto) e picos de

potenciais catódicos (Epc) (vermelho) para a reação de redução de O₂ sob diferentes valores de pH..... 46

Figura 22. Medidas cronoamperométricas simultâneas dos eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT (PdNPs, 12,1 nm) (preto) com E = 0,1 V vs. Ag/AgCl e eletrodo de platina (vermelho) mantido a E = 0,6 V vs. Ag/AgCl em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0), sob agitação constante de 1000 rpm a adições de H₂O₂ (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 e (e) 5 mmol L⁻¹... 48

Figura 23. Voltamogramas cíclicos para a reação de redução de oxigênio realizado usando eletrodos de disco rotativos modificados com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, sob argônio (preto) e saturado com O₂ (em cores), em diferentes velocidades de rotação, com das PdNPs (A) 12,1 ± 1,7 nm, (B) 16,1 ± 2,3 nm, (C) 19,1 ± 2,2 nm, (D) 22,5 ± 2,6 nm..... 50

Figura 24. Correlação linear entre a corrente electrocatalítica e a velocidade de revolução para cada tamanho das PdNPs nos RDE modificados com PdNPs/MWCNT. Os valores de corrente foram extraídos dos experimentos de voltametria cíclica em -0,4 V (em solução tampão de *Mcllvaine* pH 6,0). 51

Figura 25. Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio utilizando eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) em velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ utilizando o eletrodo respirante de GDL (preto) e eletrodo de GC sob oxigênio dissolvido (vermelho) e eletrodo de GC não modificado sob argônio (pontilhado em preto). 53

Figura 26. Diferentes quantidades de PdNPs (μg cm⁻²), (A) voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹ e (B) cronoamperometria em E = 0,0 V, em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0), testados nos eletrodos de GDL-PdNPs/MWCNT, com as nanopartículas cúbicas de 12,1 nm..... 54

Figura 27. Valores de corrente relativas (I/I₀) vs. tempo para diferentes condições de armazenamento a temperatura ambiente: expostos ao ar atmosférico (quadrados pretos) e em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) (círculos vermelho). A corrente foi extraída de experimentos de voltametria cíclica em 0,0 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, sempre relativas à terceira varredura..... 55

Figura 28. (A) Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio realizado utilizando eletrodo de GDL modificado com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0) inicialmente saturado com O₂, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ e (B) Cronoamperometria utilizando eletrodo de GDL modificado com

PdNPs/MWCNT, em tampão de *McIlvaine* (pH 7,0), em 0,0 V vs. Ag/AgCl.
..... 56

Figura 29. Voltamogramas cíclicos representativos das diferentes quinonas adsorvidas nos eletrodos modificados com os MWCNT em solução tampão de *McIlvaine* (pH 7) com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. AQS (linha), PQ (tracejado) e PLQ (pontilhado). 58

Figura 30. Voltamogramas cíclicos representativos das diferentes quinonas adsorvidas nos eletrodos modificados com os MWCNT, (A) AQS, B (PQ) e (C) PLQ, em solução tampão de *McIlvaine* (pH 7) com velocidade de varredura de 5, 10, 20 e 50 mV s⁻¹. 59

Figura 31. Representação esquemática mostrando a adsorção competitiva pela superfície dos nanotubos de carbono pela PLQ e pir-NHS. 60

Figura 32. Representação esquemática da modificação da enzima GDH com pir-NHS (etapa 1) e a dupla funcionalização dos nanotubos de carbono com PLQ e pir-GDH (etapa 2). 61

Figura 33. Representação esquemática do eletrodo contendo os nanotubos de carbono bifuncionalizados com PLQ e GDH. 62

Figura 34. Aumento da densidade de corrente após as subsequentes adições de NADH sobre o eletrodo modificado com PLQ/MWCNTs. Dados obtidos de experimentos de cronoamperometria. O ponto equivalente à concentração de 10 mmol L⁻¹ de NADH representa os experimentos realizados em triplicata, em tampão de *McIlvaine* (pH 7,0). 63

Figura 35. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com PLQ/pir-GDH/MWCNT em tampão de *McIlvaine* (pH 7,0), (a) sem adição de glicose (b) com glicose 100 mmol L⁻¹ e NAD⁺ 2 mmol L⁻¹, e (c) com glicose 100 mmol L⁻¹ e NAD⁺ 10 mmol L⁻¹ com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. 64

Figura 36. Voltamogramas cíclicos do eletrodo contendo os MWCNT não modificados, em solução tampão de *McIlvaine* (pH 7,0), com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹, sem adição de NADH (linha pontilhada), e na presença de 2 mmol L⁻¹ de NADH. 65

Figura 37. (A) Cronoamperometria referente aos eletrodos modificados com PLQ/pir-GDH/MWCNT em tampão de *McIlvaine* (pH 7,0) contendo NAD⁺ 2 mmol L⁻¹, com sucessivas adições de glicose ao meio, nas concentrações de (a) 1, (b) 2, (c) 4, (d) 6, (e) 8, (f) 20, (g) 50 e (h) 100 mmol L⁻¹. (B) Aumento da densidade de corrente catalítica após as subsequentes adições de glicose. Dados obtidos de experimentos de cronoamperometria. O ponto vermelho representa os experimentos realizados em triplicata, em

tampão de McIlvaine (pH 7,0) contendo NAD^+ 2 mmol L^{-1} e glicose 100 mmol L^{-1} 66

Figura 38. Voltamogramas cíclicos de (A) eletrodos a base de PdNPs/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0) (linha preta), e na presença de glicose 50 mmol L^{-1} (linha vermelha), e (B) eletrodos a base de PdNPs/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0) sob diferentes condições de concentração de oxigênio, e na presença de NADH 2 mmol L^{-1} . Ambos os experimentos realizados com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} 67

Figura 39. Voltamogramas cíclicos referente aos eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT, em solução tampão McIlvaine (pH 7,0), apenas na presença do tampão (linhas pretas), na presença de glicose (linhas vermelhas), e na presença de glicose e NAD^+ (linhas azuis). (A) eletrodo de GC modificado, 50 mmol L^{-1} de Glicose e 2 mmol L^{-1} de NAD^+ , com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , e (B) eletrodo de GDL modificado, 100 mmol L^{-1} de Glicose e 2 mmol L^{-1} de NAD^+ , com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Todos os voltamogramas são referentes a segunda varredura. 68

Figura 40. Representação esquemática da célula híbrida a combustível de glicose/ O_2 , referente à conformação utilizando o catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL combinado com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC, na presença de NAD^+ e glicose..... 69

Figura 41. Polarização (linha sólida) e curva de potência (linha tracejada) obtidos do catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL (preto) e catodo PdNP/MWCNT/GC sob condições quiescentes (vermelho). Ambos combinados com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC em uma célula híbrida a biocombustível, na presença de 2 mmol L^{-1} de NAD^+ e 50 mmol L^{-1} de glicose, em solução tampão de McIlvaine (pH 7,0). A voltametria de varredura linear foi realizada com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} 70

Figura 42. Polarização (linha sólida) e curva de potência (linha tracejada) obtidos do catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL (preto) e catodo PdNP/MWCNT/GC sob fluxo contínuo de O_2 (vermelho). Ambos combinados com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC em uma célula a biocombustível, na presença de 2 mmol L^{-1} de NAD^+ e 50 mmol L^{-1} glicose, em solução tampão de McIlvaine (pH 7,0). A voltametria de varredura linear foi realizada com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} 71

Figura 43. Gráficos da corrente de pico anódico (I_{pa}) vs. a velocidade de varredura relativo as quinonas (A) AQS ($\text{slope} = 5,834$ e $R^2 = 0,9750$), (B) PQ ($\text{slope} = 20,832$ e $R^2 = 0,9814$) e (C) PLQ ($\text{slope} = 16,299$ e $R^2 = 0,9962$)..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações iniciais dos reagentes na reação de síntese de nanopartículas cúbicas de paládio.....	28
Tabela 2. Concentrações iniciais de HCl na reação de síntese de nanopartículas cúbicas de paládio.....	29
Tabela 3. Percentual de Pd nas amostras de PdNPs isoladas.	40

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica, do inglês, <i>Atomic absorption Spectroscopy</i>
AQS	Antraquinona 2-Sulfonato de Sódio
BR	Tampão <i>Britton-Robinson</i>
CA	Cronoamperometria
<i>cfc</i>	Cúbico de face centrada
CNFs	Nanofibras de Carbono, do inglês, <i>carbon nanofibers</i>
CNTs	Nanotubos de Carbono, do inglês, <i>carbon nanotubes</i>
CV	Voltametria Cíclica, do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>
DET	Transferência Direta de Elétrons, do inglês, <i>Direct Electron Transfer</i>
EBFC	Biocélulas a Combustível Enzimáticas, do inglês, <i>enzymatic biofuel cells</i>
EDS	Espectrometria dispersiva de raios X, do inglês, <i>energy dispersive spectroscopy</i>
EG	Etileno Glicol
FAD	Dinucleótido de Flavina e Adenina, do inglês, <i>flavin adenine dicucleotide</i>
GC	Eletrodos de Carbono Vítreo, do inglês, <i>glass carbon electrode</i>
GDH	Glicose Desidrogenase
GDL	Camada de Difusão de Gases, do inglês, <i>gas diffusion layer</i>
GOx	Glucose Oxidase
HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, do inglês, <i>high-resolution transmission electron microscopy</i>
MCOs	Oxidases de Multicobre, do inglês, <i>multicopper oxidases</i>
MET	Transferência de Elétrons Mediada, do inglês, <i>Mediated Electron Transfer</i>
M-NPs	Nanopartículas metálicas
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas, do inglês, <i>Multi-walled carbon nanotubes</i>
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, do inglês, <i>nicotinamide adenine dicucleotide</i>
NAD ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina na Forma Oxidada
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina na Forma Reduzida

NC	Número de coordenação
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
OCV	Voltagem de circuito aberto, do inglês, <i>open circuit voltage</i>
ORR	Reação de Redução de oxigênio, do inglês, <i>oxygen reduction reaction</i>
Pd-NPs	Nanopartículas de paládio
PEMFC	Células a Combustível de Eletrólito de Membrana Polimérica, do inglês, <i>polymer electrolyte membrane fuel cells</i>
pir-NHS	Ácido <i>N</i> -hidroxisuccinimida-1-Pireno Butírico Ester
PLQ	1,10-Fenantrolina-5,6-iona
PQ	9,10-Fenantrenoquinona
PQQ	Pirroloquinolina Quinona, do inglês, <i>pyrroloquinoline quinone</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RDE	Eletrodos de Disco Rotatório, do inglês, <i>rotating disk electrodes</i>
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês, <i>Scanning Electron Microscopy</i>
SWCNTs	Nanotubos de Carbono de Paredes Únicas, do inglês, <i>Single-walled carbon nanotubes</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioleta e Visível
XRPD	Difração de raios X em Pó, do inglês, <i>X-ray Powder Diffraction</i>

1. INTRODUÇÃO

A investigação de processos redox, com capacidade de aplicação em células híbridas a biocombustível, é um campo da eletrocatalise que envolve áreas interdisciplinares e gera grande interesse em pesquisas modernas. Entretanto, o desenvolvimento de células a biocombustível com possibilidade de aplicações reais depende fortemente de que estes dispositivos apresentem como requisitos básicos altas densidades de corrente, potência e de longa estabilidade.

Como as abordagens para que estes requisitos sejam alcançados de forma satisfatória passam por diversos campos da ciência, há uma ampla gama de possibilidades reais em diferentes disciplinas que podem contribuir nestas pesquisas.

Neste contexto, pesquisas que envolvem eletrocatalisadores eficientes para a reação de redução de oxigênio são extremamente importantes, tendo em vista que na maioria dos casos o eletrodo que funciona como cátodo da célula representa o eletrodo limitante. Atualmente, os eletrocatalisadores constituídos a base de platina são os materiais escolhidos para a maioria dos cátodos empregados para a ORR em células a combustível de eletrólito de membrana polimérica (PEMFC). Entretanto, devido ao alto custo deste catalisador, há a necessidade da busca por catalisadores alternativos.¹

Alternativo ao uso da platina para a ORR, o uso de catalisadores biológicos, como algumas metaloenzimas, tem demonstrado ótimas propriedades bioeletrocatalíticas para a ORR, como as oxidases de multicobre (MCOs), que as tornam adequadas para o desenvolvimento de biocátodos para biocélulas a combustível enzimáticas (EBFC).^{2; 3; 4} Entretanto, a estabilidade a longo prazo continua ainda a ser um desafio, pois até os biocátodos que desempenham a melhor performance apresentam estabilidade por alguns meses apenas, diminuindo sua estabilidade e com isso sua eletroatividade a longo prazo, isso quando comparada a de cátodos a base de metais nobres.⁵

Outra possibilidade que pode ser uma candidata ao uso dos catalisadores citados é o uso de paládio. O paládio pertence ao mesmo grupo que a platina, que é o catalisador metálico mais ativo para a ORR, e ainda possui propriedades químicas e físicas similares ao Pd,⁶ que apresenta atividade eletrocatalítica para a oxidação de uma ampla gama de substratos, como ácido fórmico^{7; 8}, álcoois,⁹ hidrogênio¹⁰ ou glicose^{11; 12}. É conhecido que o paládio sozinho ou agregado a ligas metálicas, apresenta atividade catalítica para a reação de redução de oxigênio, que foi primeiramente reportada em 1967.¹³ Outras vantagens quanto ao uso de paládio, é que se

comparado com a platina^{14; 15}, ele possui maior viabilidade econômica^{14; 15}. Adicionalmente, como se trata de um metal nobre, os cátodos baseados em paládio devem apresentar maior estabilidade e com isso maior robustez do que os biocátodos citados anteriormente.

O uso de nanopartículas de paládio para a reação de redução de oxigênio é reportado na literatura demonstrando a influência quanto ao seu tamanho^{16;17} e morfologia.^{18; 19; 20} Nanopartículas de Pd tem revelado boa atividade electrocatalítica para a ORR, tanto em meios ácidos,^{19; 20; 21} quanto em neutros²² e básicos.^{23; 24} Essas publicações demonstram o potencial uso das nanopartículas de paládio como electrocatalisadoras em cátodos aplicados a biocélulas a combustível enzimáticas híbridas em comparação com as MCOs. Assim como a atividade catalítica de biocatalisadores é drasticamente afetada dependendo do pH do eletrólito utilizado,^{25; 26} o uso de nanopartículas cúbicas de paládio pode permitir o ajuste do pH, conforme a enzima utilizada no bioanodo, para corresponder a sua melhor atividade e estabilidade.

Uma maneira de aumentar a capacidade catalítica de reações electroquímicas com electrocatalisadores constituídos de paládio é o desenvolvimento de compostos híbridos nanométricos suportados a carbono. Existe evidências do aumento da atividade frente a reação de redução de oxigênio para nanopartículas de Pd combinadas com nanotubos de carbono (CNTs),²⁷ nanofibras de carbono (CNFs)²⁸ ou grafeno.²⁹

Este estudo tem como objetivo identificar as melhores condições para as nanopartículas cúbicas de Pd suportadas em CNTs, como uso alternativo ao alto custo da Pt ou a baixa estabilidade quando enzimas redox são utilizadas como catalisador em uma célula híbrida a biocombustível. As investigações iniciais foram conduzidas com eletrodos de disco rotatório (RDE) para a comparação do cátodo modificado com as nanopartículas cúbicas de diferentes tamanhos imobilizadas na superfície dos CNTs. Para contornar os fortes efeitos relativos às limitações relativas a concentração/difusão de O₂ no eletrólito, foram utilizados eletrodos com camada de difusão de gases (GDL) para o aumento da performance catalítica do cátodo na ORR.

Finalmente, os cátodos nanométricos formados pelas nanopartículas cúbicas de Pd com os CNTs, foram combinados com o bioânodo modificado com a enzima glicose desidrogenase (GDH) NAD-dependente para a confecção de uma célula híbrida à biocombustível de glicose/O₂ completa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (M-NPS)

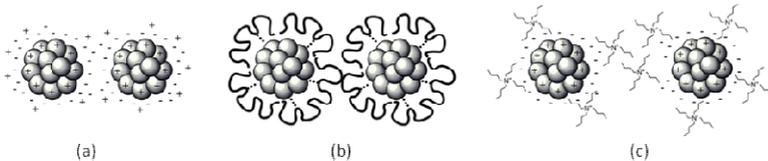
Cada vez mais aumenta o interesse por pesquisas que envolvem nanopartículas devido ao seu crescente potencial gerado por diversas aplicações, como catálise e células combustíveis.³⁰ Nanopartículas metálicas apresentam propriedades físico-químicas únicas por serem consideradas como um estado da matéria intermediário entre o atômico e estendido (*bulk*)^{31,32}. Um dos fatores que mais afeta as propriedades das nanopartículas é o tamanho. Em sistemas coloidais, as nanopartículas podem ser definidas como partículas isoláveis de tamanho entre 1 e 100 nm, protegidas por uma camada protetora que evita a sua aglomeração; e que podem ser redispersas em água (hidrossóis) ou em solventes orgânicos (organossóis)³³.

Nanopartículas pequenas são altamente atrativas em sistemas catalíticos devido a sua relação superfície/volume. Esta relação aumenta inversamente proporcional ao raio³³. Isto é, na comparação com partículas de maior diâmetro, partículas menores apresentam maior porcentagem de átomos na superfície³¹.

Os átomos que se encontram na superfície das partículas estão expostos a um ambiente químico diferente dos que estão em seu interior. Os átomos da superfície possuem um menor número de coordenação, fazendo deles termodinamicamente instáveis e altamente energéticos, o que os torna mais capazes de realizar interações químicas³⁴, promovendo os processos catalíticos.

Pelo fato das nanopartículas serem termodinamicamente instáveis em solução, faz-se necessário que haja uma estabilização adequada para evitar o processo de agregação, o que é possível pelo uso de agentes estabilizantes. A escolha do estabilizante é de fundamental importância, pois no caso desse estar associado fracamente ao metal, a estabilização poderá ser ineficiente e poderá ocorrer agregação³⁵. A eficácia desta estabilização ocorre pela compensação das forças atrativas de *van der Waals*, por meio de forças opostas de repulsão estéricas e/ou eletrostáticas entre íons adsorvidos e contra íons associados, representado pela Figura 1³⁶.

Figura 1. : Estabilização (a) eletrostática, (b) estérica e (c) eletroestérica.

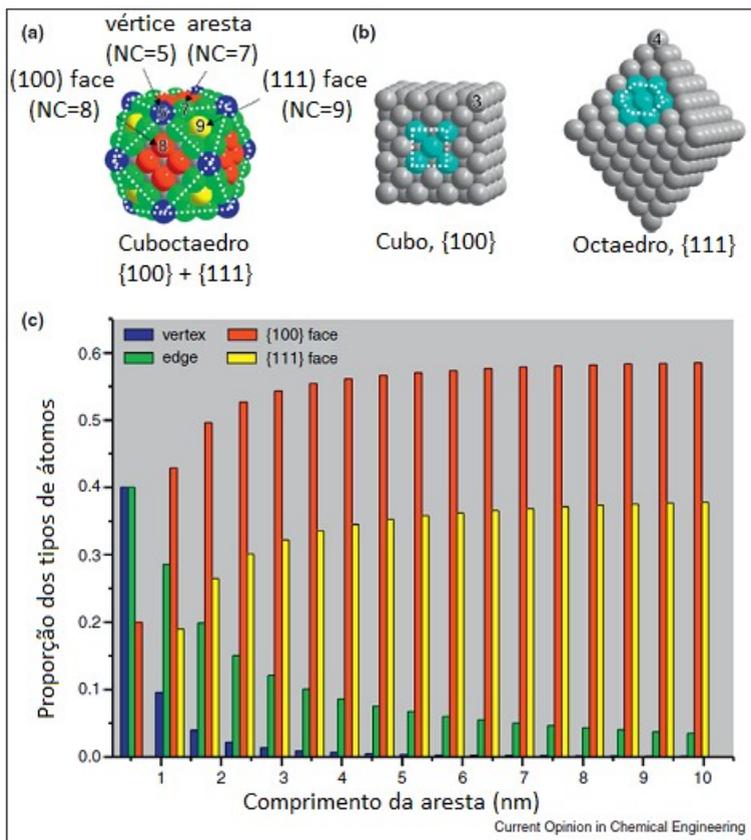


Assim como o tamanho, a forma das nanopartículas também está associada diretamente com suas propriedades catalíticas^{37; 38; 39}. Essa característica atua de uma maneira mais importante na determinação da seletividade, devido ao arranjo cristalino dos átomos de superfície^{34; 40; 41}.

Átomos situados em diferentes sítios como vértices, arestas e faces, possuem distintos números de coordenação (Figura 2a) e, por sua vez, variadas: energias superficiais; forças de interação; adsorção na superfície; e reatividade, devido a mudanças nas estruturas eletrônicas que podem surgir a partir de cada ambiente químico onde os átomos da superfície estão sujeitos⁴².

A forma de um nanocristal pode influenciar nas proporções dos diferentes átomos de superfície⁴³, apesar de ela ser mais efetiva ao induzir o arranjo de átomos em sua face⁴⁴. Para um metal que apresenta sua célula unitária do tipo cúbica de face centrada (*fcc*), as faces para um cubo e um octaedro ideais são exclusivamente recobertas pelas faces do tipo (100) e (111) respectivamente, com os seus átomos arranjados de forma matricial quadrada e hexagonal (Figura 2b)⁴⁵. Através da Figura 2c, é possível observar também a razão dos átomos dos vértices e arestas em relação aos átomos das faces para nanopartículas cuboctaédricas de Au. Esta razão aumenta drasticamente ao mesmo tempo em que o tamanho das partículas é reduzido.

Figura 2. Modelos que ilustram as estruturas atômicas para nanocristais metálicos do tipo cúbico de face centrada em três formas distintas com diferentes arranjos atômicos em sua superfície. (a) Modelo atômico de um cuboctaedro contendo três camadas atômicas, evidenciando os diferentes tipos de átomos de superfície e seus números de coordenação (NC). (b) Modelos atômicos de nanopartículas cúbicas e octaédricas respectivamente. (c) Proporção dos diferentes tipos de átomos de superfície em função do tamanho das arestas para cuboctaedros de Au (adaptada da referência⁴⁵).



2.1.1. Síntese de Nanopartículas Metálicas

Normalmente, a síntese de nanopartículas metálicas é realizada por dois processos distintos: químicos (*bottom up*) e físicos (*top down*)^{46; 47}, com o objetivo de obter nanopartículas pequenas e com baixa dispersão em relação à forma e ao tamanho. O método químico prevalece como a melhor opção, sendo realizado em solução, a partir da redução de íons metálicos, por meio de um agente redutor e estabilizante⁴⁸.

A habilidade de controlar a forma de nanopartículas metálicas gera uma excelente oportunidade para a investigação sistemática de suas capacidades catalíticas. Nos últimos anos, o controle sobre a forma tem recebido maior atenção na exploração de nanocristais de metais nobres⁴⁹. No caso do paládio, diferentes formas já foram sintetizadas pela manipulação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos envolvidos no processo de crescimento das nanopartículas^{43; 50}.

O processo de formação das nanopartículas em solução pode ser dividido basicamente em duas etapas. Sendo a primeira, a nucleação (formação de núcleos e então sementes), funcionando como modelo para a segunda etapa³⁰, o crescimento, que consiste na evolução das sementes em nanocristais através da adição de mais átomos.

A forma final dos nanocristais é o resultado de muitos parâmetros, incluindo a cristalinidade ou estrutura das sementes, a velocidade de deposição dos átomos à superfície e os efeitos de agentes passivadores, graças às espécies moleculares ou iônicas presentes na solução⁵¹.

Younan Xia e col. estudaram as funções desempenhadas pelo citrato sódico e a polivinilpirrolidona (PVP) como agentes de proteção em sínteses de nanocristais mediados por sementes de Ag com formas controladas. Foi demonstrado neste estudo que o citrato de sódio e PVP ligam-se seletivamente às faces Ag (111) e Ag (100) respectivamente, favorecendo a formação nanocristais de Ag com suas superfícies apresentando preferencialmente as faces (111) ou (100)⁵². Isto é, quando o PVP se liga seletivamente a Ag(100), isso faz com que sua energia superficial seja menor que da Ag(111), resultando na formação de nanocubos e nanobarras com faces do tipo (100). Em contraste, o citrato demonstrou se ligar mais fortemente a Ag(111) do que a Ag(100), favorecendo a formação de nanopartículas com as faces (111) dispostas na superfície.

Esta preferência morfológica no processo de síntese das nanopartículas é atribuída a adsorção preferencial destes agentes de proteção em um plano cristalográfico específico. Desta forma, atua como um agente passivador para o posterior crescimento, favorecendo a deposição dos átomos metálicos nas direções não passivadas^{45; 52}.

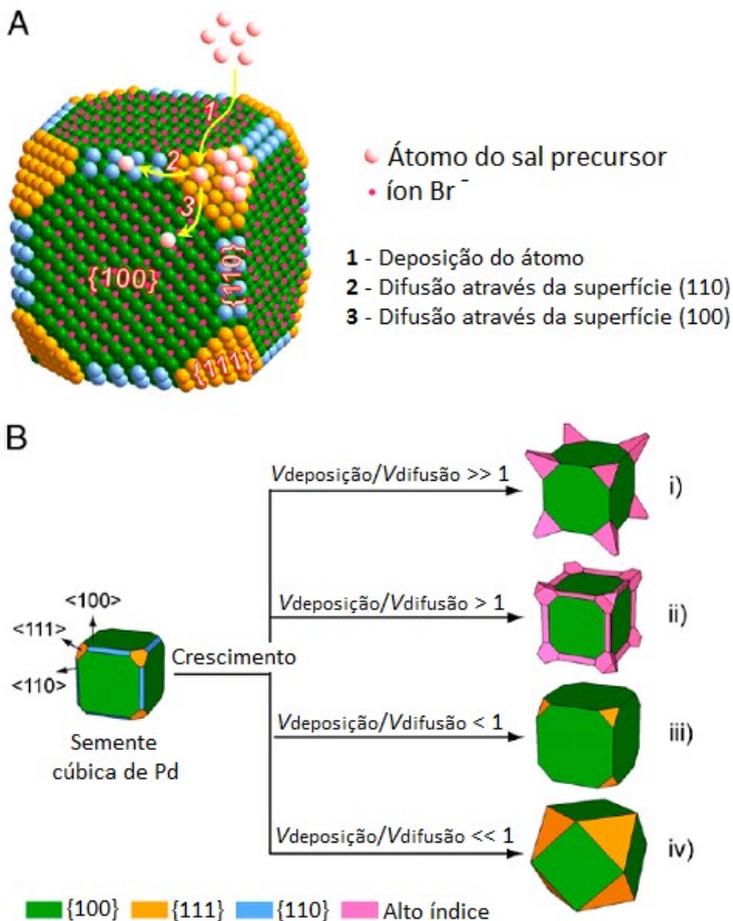
Além do PVP³⁸, a adição de Br⁻ como agente passivador de superfície, também contribui para a promoção das faces (100) em nanocubos de Ag^{53; 54}. Este comportamento também é observado no processo de crescimento de nanocristais de Pd^{41; 55}, Au e Pt⁵².

A manipulação da velocidade de adição, nas quais os átomos metálicos são adicionados em diferentes planos cristalográficos nas sementes, também é uma estratégia para controlar o padrão de crescimento, e assim, a morfologia final da nanopartícula.

Quando um átomo é reduzido e adicionado à superfície do nanocristal, este átomo se difunde pela superfície em busca de um local onde possa ser incorporado. O crescimento total do cristal é então controlado pela competição entre a diminuição da energia (favorecendo o crescimento) e um aumento da energia de superfície (favorecendo a dissolução)⁴⁹. É esta interação dinâmica de crescimento e dissolução que dita a evolução das sementes em nanocristais. Mesmo com o avanço da Microscopia Eletrônica, que possibilita a elucidação das estruturas internas e morfologias das sementes e nanocristais, este tipo de estudo só pode ser realizado de forma *ex situ* para processos limitados. Uma total elucidação dos detalhes mecanísticos envolvidos no processo de crescimento de nanocristais é muito dificultada em análises *ex situ*.

Younam Xia e coautores demonstraram o papel da difusão superficial na determinação da via de crescimento de nanopartículas pela avaliação da morfologia final dos nanocristais metálicos e propuseram o mecanismo pelo qual o processo ocorre⁵⁵. Para isso escolheram nanocubos de Pd como sementes em um sistema modelo, com suas seis faces passivadas por íons Br⁻, para assegurar a deposição seletiva dos átomos nos vértices durante o processo de crescimento. Demonstraram assim que através do controle das condições reacionais, como a velocidade de deposição (controlada pela velocidade de injeção do Na₂PdCl₄) e a velocidade de difusão (controlada pela variação da temperatura no meio), torna-se possível controlar a forma final dos nanocristais, Figura 3.

Figura 3. Efeito da difusão de superfície sobre o padrão de crescimento de uma semente cúbica de Pd. Esquemas de (A) três opções diferentes para a difusão dos átomos de Pd adicionados ao vértice de uma semente cúbica Pd cujas faces laterais são cobertas por íons Br^- , e (B) diferentes vias e as formas correspondentes ou morfologias esperadas para o crescimento de uma semente cúbica de Pd em quatro condições diferentes. O tamanho dos íons Br^- foi reduzido em relação aos átomos de Pd para mostrar a estrutura da superfície de forma mais clara. (reproduzido da referência⁵⁵).



Ainda, reporta-se na literatura várias estratégias sintéticas baseadas na corrosão oxidativa, no uso de agentes passivadores e no controle cinético que têm sido utilizadas para direcionar a síntese de nanopartículas com morfologias definidas⁴³. O uso de espécies químicas com diferentes poderes de redução também pode auxiliar na manipulação cinética desse processo, resultando na formação de nanocristais de Pd com diferentes formas e tamanhos³⁹.

O controle de tamanho das nanopartículas também pode ser realizado por meio de interrupção da reação em diferentes estágios de crescimento dos nanocristais⁵⁴. Entretanto, como a forma das nanoestruturas apresenta uma grande inconsistência nos estágios iniciais de crescimento⁵⁶, isto pode causar modificações em suas propriedades relativas à forma final. Outra consequência é não fazer uso de todo o metal disponível no meio reacional.

A adição de haletos, como Br⁻ e Cl⁻, pode alterar também o tamanho final de nanocubos de Pd pela formação de complexos com íons Pd²⁺ e assim retardar a velocidade de reação. Um exemplo reportado foi a síntese de nanocubos de Pd com 6 nm de tamanho formados com a adição ao meio reacional de 4 mmol L⁻¹ de KBr e 226 mmol L⁻¹ de KCl. Sendo assim, o aumento da concentração de KBr para 226 mmol L⁻¹ resultou no aumento do tamanho dos nanocubos para 18 nm⁴³.

Inspirados no trabalho de Youman Xia e coautores – que demonstraram a possibilidade do acompanhamento do crescimento de nanopartículas cúbicas de Ag por UV-vis pelo controle da velocidade de crescimento pelo uso de HCl como agente de corrosão oxidativa⁵³ –, Xiong e coautores empregaram este procedimento para o desenvolvimento de uma metodologia que permitisse o controle do tamanho final de nanocubos de Ag⁵⁷. Isto foi possível, mediante manipulação da velocidade de nucleação por intermédio de um processo de corrosão que compete com o processo de redução do metal, fazendo com que a velocidade de redução diminua substancialmente. Assim, esta manipulação sobre a nucleação pode efetivamente reduzir o número de núcleos e com isso promover um aumento no tamanho das partículas finais para uma mesma concentração de sal metálico precursor. Este procedimento se mostrou eficiente não apenas para a síntese de nanopartículas de cúbicas de Ag, mas também para nanopartículas cúbicas e cuboctaédricas de Pd⁵⁷.

A escolha do solvente, que se deseja realizar a síntese das nanopartículas, também é um fator a ser levado em consideração. O uso de solventes orgânicos como o Etileno Glicol (EG) tanto para a solubilização de sais metálicos (precursores de metais nobres) como também devido ao seu poder redutor a altas temperaturas, é amplamente utilizado. Entretanto, este processo muitas vezes é acompanhado por problemas referentes à reprodutibilidade das formas dos nanocristais obtidos, que são associados às impurezas existentes (conhecidas ou desconhecidas) que usualmente estão presentes em reagentes comerciais como o EG^{39; 49; 54; 57}. O uso de água como solvente em reações de sínteses de nanopartículas, além de evitar o uso de solventes tóxicos em seu processo, possibilita o uso de diversos agentes redutores que são seguros e de fácil manipulação, tais como, o ácido L-ascórbico e ácido cítrico. Também se destaca a facilidade na obtenção de água com alto teor de pureza, a conveniência de uso, simplicidade e grande potencial para uso em processos de larga escala.

2.1.2. Catálise por nanopartículas metálicas

O catalisador é uma espécie química que acelera a velocidade de uma reação química no progresso dos reagentes aos produtos sem ser consumido durante a reação, desempenhando um papel fundamental para variadas reações, especialmente em escala industrial⁴⁸. Neste contexto, o uso de nanopartículas na catálise de reações orgânicas torna-se uma opção bastante interessante. Pois, as nanopartículas possuem grande razão entre área superficial e volume na comparação com catalisadores homogêneos tradicionais, apresentando também a possibilidade de reciclagem após uso. Além de poderem, por exemplo, ser suportadas em sistemas mesoporosos para posterior utilização.

Um dos objetivos mais importantes da ciência de superfície aplicado à catálise heterogênea é investigar a relação existente entre atividade e estrutura em reações catalisadas na superfície do catalisador. Neste contexto, o fato de a partícula possuir diferentes sítios na sua superfície, de acordo com a sua forma, é uma característica relevante. No caso das nanopartículas metálicas com diferentes formas, resulta-se numa maior atividade catalítica, de maneira geral, quanto maior for a porcentagem de cantos, vértices e arestas na partícula⁴⁰.

Em geral, quanto maior for sua área superficial, e por consequência menor o tamanho da nanopartícula, maior será sua atividade catalítica⁵⁸, fazendo com que nanopartículas pequenas sejam altamente atrativas em sistemas catalíticos. Porém, sistemas com nanopartículas pequenas podem apresentar menor estabilidade e tendência a sofrerem agregação com mais facilidade⁵⁹. O ambiente químico ao qual o catalisador é exposto durante

uma reação química também pode afetar sua estabilidade gerando um aumento do seu tamanho médio após o ciclo catalítico, como já foi observado para a reação de Suzuki entre o ácido fenilborônico e iodobenzeno catalisadas por nanopartículas de Pd estabilizadas com PVP⁶⁰.

Desta forma, é importante que se atinja um equilíbrio entre reatividade e estabilidade, pois o agente estabilizante pode alterar a atividade catalítica de forma considerável. Afinal, quanto melhor se der a estabilização da nanopartícula, mais átomos da superfície do catalisador serão ocupados por uma adsorção irreversível, assim, podendo afetar a atividade catalítica⁶¹.

2.1.3. Reação de redução de oxigênio por nanopartículas metálicas de Paládio

Catalisadores a base de paládio para a reação de redução de oxigênio têm recebido uma grande atenção por serem considerados substitutos potenciais da platina utilizada em células a combustível. Neste sentido inúmeras pesquisas têm sido conduzidas com catalisadores nanoestruturados a base de paládio suportados, incluindo nanopartículas em diferentes tipos de suportes a base de carbono.⁶

Em meio aquoso a reação de redução de oxigênio ocorre principalmente por dois caminhos. O primeiro é referente a redução direta de O₂ para H₂O envolvendo quatro elétrons (equação 1) e o segundo a redução de O₂ para peróxido de hidrogênio (H₂O₂) envolvendo dois elétrons (equação 2), (ambas equações representam as reações em meio ácido).



A reação de redução de oxigênio por paládio é sensível a estrutura do catalisador. Estudos da reatividade de diferentes planos cristalinos de Pd para a ORR em ácido perclórico foram realizados por Hoshi e colaboradores que determinaram que a densidade de corrente relativa ao processo de redução aumenta na ordem de: Pd(110) < Pd(111) < Pd(100).⁶² Esta ordem é exatamente a inversa para Pt na mesma solução.⁶²

Paládio apresenta maior atividade catalítica para a ORR em solução alcalina que em solução ácida, devido a diminuição do efeito de envenenamento por ânions em solução alcalina. De fato, muitos estudos têm mostrado que para a reação de redução de oxigênio, a atividade de Pd/C em solução alcalina é comparável com a de Pt/C.¹⁵

Em aplicações práticas, nanopartículas de Pd podem ser suportadas em uma grande variedade de materiais que possuam boa condutividade e grande área superficial. Neste sentido novos materiais a base de carbono como nanotubos de carbono e grafeno têm apresentado performance superiores quando comparados com outros suportes a base de carbono.⁶ Esta performance catalítica superior pode ser influenciada por exemplo, pelo grau de aglomeração das nanopartículas na superfície do suporte, pela atividade do metal suportado ou pela estabilidade do nanocompósito.

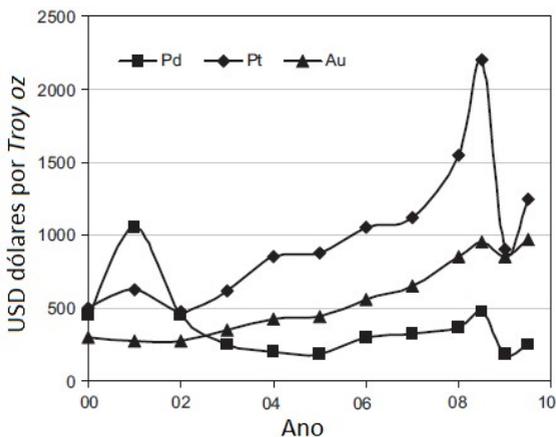
Assim como Pd(100) apresenta atividade para a ORR superior a qualquer outra face em meio ácido. Da mesma forma, é esperado que ligas metálicas com a superfície (100) também apresentem uma alta atividade catalítica para a ORR.¹⁵ Os estudos com cristais únicos de Pd e ligas de Pd são muito importantes para a compreensão da dependência de suas faces com relação à reação de redução de oxigênio, tanto em meios ácidos como básicos. Entretanto, estes estudos ainda são raros. A síntese e caracterização de nanomateriais de Pd e ligas com formas controladas são importantes para o design da próxima geração de eletrocatalisadores baseados em Pd.

2.2. CÉLULAS A BIOCOMBUSTÍVEIS

Células a combustível, são dispositivos de energia limpa, que se espera que ajudem a resolver problemas energéticos e ambientais que se tornaram predominantes em nossa sociedade. O esgotamento dos combustíveis fósseis e a necessidade de métodos de produção de energia limpa levam ao surgimento de novas fontes de energia sustentável e renovável que não emitem CO₂.

Usualmente, em células a combustível convencionais, são utilizados eletrocatalisadores à base de Pt tanto para reações no anodo quanto para as reações no catodo. O alto custo e a limitada disponibilidade deste metal precioso torna o comercialização destas células a combustível dispendiosa. Neste sentido pesquisas recentes têm concentrado esforços na descoberta de catalisadores de paládio com pouca ou nenhuma platina. A Figura 4 compara os valores dos preços por *troy oz* (*troy ounces*, unidade estadunidense para metais preciosos com equivalência de exatamente 31,1034768 g) entre Pd, Pt e Au entre os anos de 2000 e 2009. Em geral o custo do Pd é equivalente a um quarto do valor da Pt e metade do custo do Au.¹⁵

Figura 4. Comparação dos custos do Pd, Pt e Au por *troy ounce* em dólares, no período de 2000-2009, (adaptado da referência¹⁵).

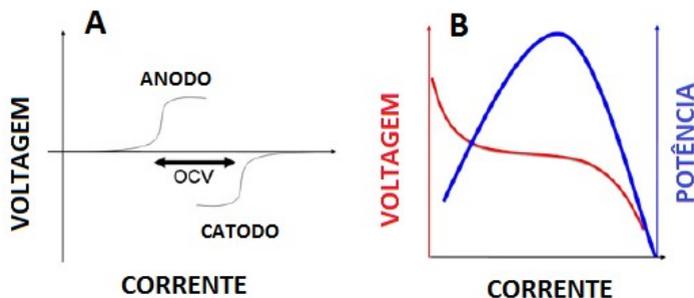


Neste sentido, o desenvolvimento e otimização de eletrodos individuais utilizando metais alternativos (como por exemplo o Pd) que são capazes de realizar reações de transferência de elétrons têm sido amplamente estudados. O que faz com que a combinação de cátodos e ânodos para o desenvolvimentos de células a combustíveis completas seja de grande interesse.

Outra alternativa é desenvolvimento de células a biocombustíveis com o emprego de biocatalisadores, como enzimas. As fontes de energia que utilizam biocatalisadores, que são altamente específicos e catalíticos para a oxidação de biocombustíveis, são candidatos promissores alternativos a uso de catalisadores de platina na pesquisa em células a combustível. Células a biocombustível que utilizam glicose como combustível são particularmente interessantes para a geração de eletricidade para dispositivos eletrônicos dentro de organismos vivos.⁶³

O princípio de funcionamento de uma célula a biocombustível é análogo ao de uma célula a combustível convencional, composta por dois eletrodos catalíticos onde a glicose é oxidada na superfície do ânodo e os elétrons que são liberados pelo processo de oxidação são conduzidos por um circuito externo gerando a corrente elétrica. Quando os elétrons atingem o cátodo, eles se combinam com um agente oxidante (normalmente oxigênio) e prótons gerando o produto (normalmente água). A Figura 5 apresenta os principais componentes e o funcionamento de uma célula a combustível enzimática.⁶⁴

Figura 6. (A) Simulação das curvas de polarização para o ânodo e cátodo e (B) Curva esquemática da polarização e perfil de potência de uma célula a combustível. (adaptada da referência⁶⁵).



O uso de mediadores, que normalmente melhora a transferência de elétrons e a corrente gerada, tende a diminuir a voltagem que pode ser produzida pela célula. Isto porque em eletrodos enzimáticos do tipo MET, o potencial é influenciado principalmente pela espécie mediadora envolvida. Quanto a este respeito, a utilização de um processo DET é mais favorável, entretanto muitas vezes há uma compensação entre o potencial obtido e a taxa de transferência de elétrons.⁶⁶

Alguns fatores no uso de enzimas como electrocatalisadores suportados, geram algumas desvantagens quanto ao seu uso. Dentre elas, a dificuldade de comunicação elétrica entre a proteína e a superfície do eletrodo,⁶⁷ o volume ocupado pelas enzimas na superfície do eletrodo, e com isso uma tendência de um menor número de sítios ativos para a realização da electrocatálise e sua baixa estabilidade quando imobilizada no eletrodo, pois a estabilidade de muitas proteínas se torna limitada quando estas estão fora de seu ambiente natural, e durante estudos eletroquímicos podem sofrer degradação.⁶⁷

Quando em uma única célula a combustível são empregados catalisadores de origens distintas na configuração de seus ânodos e cátodos, como catalisadores biológicos (enzimas) e catalisadores inorgânicos (metais), pode ser utilizado o termo célula híbrida. Esta combinação, pode render vantagens provenientes dos dois tipos de catalisadores utilizados, como a vantagem do uso de moléculas mais complexas, com maior abundância e atóxicas, como no caso da oxidação da glicose por um bioânodo, e também vantagens quanto a estabilidade e uso a longo prazo, como no caso do uso de metais nobres para a redução de oxigênio.

A possibilidade de produção de energia elétrica através de reações que utilizam catalisadores biológicos, tem impulsionado a pesquisa e

desenvolvimento de células a biocombustível como fontes de energias viáveis para alimentar dispositivos eletrônicos portáteis, assim como dispositivos implantáveis.⁶³

Majoritariamente, as células a biocombustível geram energia elétrica através a degradação enzimática da glicose e oxigênio, dois substratos presentes nos fluidos fisiológicos. Por consequência, a maior motivação para o desenvolvimento de células a biocombustível enzimáticas reside em sua implantação no corpo humano como uma fonte de energia autônoma, que em teoria gera poderia gerar energia ilimitada, sendo que o seu combustível, a glicose, é produzida de forma constante pelo organismo.⁶⁵ A primeira célula a biocombustível totalmente implantada em um mamífero foi realizada em 2010 por *Cosnier* e colaboradores⁶⁸, e representa um primeiro passo para a realização deste ousado objetivo.

A miniaturização de dispositivos médicos requer a diminuição do tamanho das fontes de energia, uma vez que o tamanho destes dispositivos é usualmente dominado pelo tamanho de suas baterias, teoricamente existe um grande número de dispositivos médicos que podem utilizar células a combustível implantáveis, como marca-passos, neuroestimuladores, dispositivos para auxiliar na visão e audição, sensores de glicose e controles de válvulas, etc.⁶⁵ Entretanto, as baixas concentrações de glicose e oxigênio nos fluidos corporais ainda são uma grande barreira para o uso em dispositivos implantáveis. Além disso, um dos grandes desafios é aumentar a voltagem e transferência de elétrons para um aumento na corrente elétrica.⁶³

Para superar questões críticas relativas ao pH da solução e à fragilidade das enzimas, pode ser necessário o uso de enzimas geneticamente modificadas para conferir um maior grau de resistência.⁶³ Outra solução poderia residir no desenvolvimento de estratégias, como o conceito introduzido por *Kerzenmacher* e colaboradores⁶⁹, em que a enzima *laccase*, utilizada para a reação de redução de oxigênio, é renovada periodicamente por enzimas, para a reposição das enzimas desorvidas das paredes de nanotubos de carbono.

Outra estratégia para aumentar a vida útil e operacional seria o uso de catalisadores puramente abióticos, ou apenas um anodo enzimático juntamente a um catodo não enzimático. O desenvolvimento de tais células híbridas de biocombustível, como o uso de nanopartículas metálicas como catalisador no catodo, pode contornar complicações incluindo a inibição encontrada por biocátodos enzimáticos em condições fisiológicas.⁶³

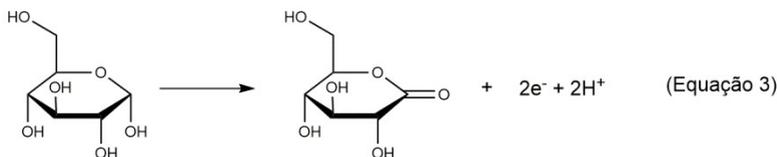
2.3. ELETRODOS ENZIMÁTICOS (REDOX) E A TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS PARA O ELETRODO

Enzimas são amplamente conhecidas pelas suas capacidades em catalisarem reações químicas. Em especial, a classe das enzimas oxirredutases, apresentam relevantes aplicações bioeletroquímicas, pois são capazes de catalisar reações de oxidação e redução pela transferência de hidrogênio ou elétrons. Um componente essencial para a atividade catalítica das oxirredutases são os cofatores redox. Os cofatores podem ser tanto de origem inorgânica como metais, ou orgânica como dinucleótido de flavina e adenina (FAD), dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), ou a pirroloquinolina quinona (PQQ).

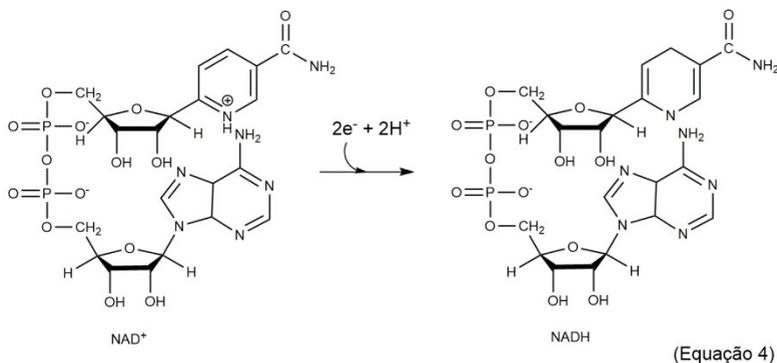
Pela importância metabólica, e pela elevada abundância natural, a glicose, além de ser um importante intermediário metabólico e fonte de energia para uma grande variedade de organismos vivos, é um combustível que apresenta potencial para aplicações em células a biocombustível, que assim com outros tipos de açúcares, como frutose, sacarose, celobiose, maltose ou lactose, podem ser utilizados como substratos para reações de oxidação catalisadas por enzimas.⁷⁰

Dentre as enzimas capazes de realizar a oxidação da glicose, uma das mais utilizadas na construção de biossensores e células a biocombustível é a glicose oxidase (GOx), que apresenta como cofator responsável por sua atividade catalítica a FAD⁷¹. A GOx é capaz de realizar a conversão da glicose em gluconolactona que se hidroliza espontaneamente em ácido glucônico. Entretanto, o aceptor de elétrons para a GOx é o oxigênio, o que torna complicada a utilização da GOx em eletrodos para células a combustível que não utilizam membranas em sua configuração, pois o oxigênio compete pelo elétron liberado com o eletrodo causando uma diminuição na densidade da corrente anódica. Outro fator importante é que no processo de redução de oxigênio, é capaz de gerar peróxido de hidrogênio na vizinhança do eletrodo, que por ser uma espécie com propriedade oxidante forte, torna-se prejudicial para os componentes biológicos como as enzimas.

Já a enzima glicose desidrogenase (GDH) é uma enzima que apresenta uma vantagem sobre a GOx no uso em células a biocombustível, pelo fato de o oxigênio não ser um aceptor natural de elétrons, e também, por ser capaz de oxidar substratos, como glicose gerando a glucono-1,5-lactona (equação 3).



Como a GDH é uma enzima NAD-dependente, o seu uso como electrocatalisador imobilizado no anodo requer o uso de um catalisador electroquímico para a oxidação do NADH, que seja capaz de maximizar a corrente catalítica anódica e minimizar o sobrepotencial de oxidação do NADH^{72, 73} que é gerado no processo de oxidação da glicose (equação 4).



. Para este processo de regeneração do NAD⁺, Reuilard e colaboradores reportaram o uso de um complexo de Ru(II) ligado a dois ligantes 1,10-fenantrolina-5,6-diona⁷³, o que sugere que grupos quinonas são potenciais catalisadores electroquímicos para a oxidação do NADH, e mediadores redox eficientes.

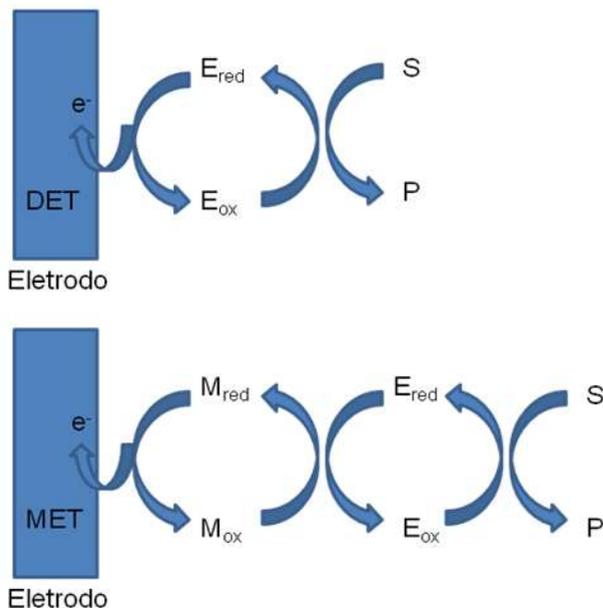
Para o uso de enzimas em uma célula a biocombustível, é de grande importância o desenvolvimento de um procedimento de modificação do eletrodo que possa preservar a atividade da enzima, promovendo um ambiente propício para uma transferência eficiente de elétrons da superfície do eletrodo ou para a superfície do eletrodo. A forma como esta transferência de elétrons ocorre determina a configuração do eletrodo.

Se uma enzima é capaz de realizar a transferência de elétrons diretamente para o eletrodo, este processo é determinado como transferência direta de elétrons (DET), principalmente com o auxílio de eletrodos modificados com CNTs,⁷¹ em um processo possível de ser realizado apenas por uma pequena parte das enzimas redox, pelo fato de que poucas possuem a capacidade de permitirem que seus centros ativos fiquem próximos a superfície do eletrodo.⁷² Entretanto, na maioria dos casos, o centro ativo

redox da enzima, é protegido pelo ambiente da proteína, e portanto torna a transferência de elétrons lenta ou não possível de ser realizada.⁶⁷ Neste caso, com o objetivo de superar esta barreira cinética para a transferência de elétrons, uma espécie redox ativa, chamada de mediador, pode ser utilizada no sistema electrocatalítico. Este processo para a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo é chamado de transferência de elétrons mediada (MET).⁷⁴

A reação enzimática pode ser descrita como um processo de reações consecutivas, tanto para um processo DET como MET, exemplificada na Figura 7, no caso da reação de oxidação sobre o eletrodo.

Figura 7. Esquema da transferência de elétrons direta (DET) e mediada (MET)



Para a reação de transferência de elétrons acima exemplificada, o primeiro passo é a reação enzimática que pode ser descrita pelo mecanismo de Michaelis-Menten, seguido da reação de regeneração. Essa envolve a redução da enzima que pode ser pelo processo direto (DET) ou pelo processo de utilizar um mediador (MET). Quando a transferência de

elétrons ocorre por DET, a corrente medida no eletrodo é gerada diretamente pela reoxidação da enzima na sua forma reduzida, e no caso da transferência por MET, a corrente é proveniente da reoxidação do mediador sobre o eletrodo.

2.3.1. Modificação enzimática de eletrodos.

Para a construção de bioeletrodos, está descrito na literatura uma ampla variedade de estratégias para a imobilização de enzimas e mediadores, por exemplo, uma simples adsorção física,⁷³ ligações covalentes⁷⁵ e o aprisionamento em polímeros.⁶⁴ Muitas destas estratégias de imobilização são o resultado da aplicação de mais de um destes métodos combinados.

Os eletrodos enzimáticos, quando comparados com eletrodos modificados convencionais, costumam apresentar uma maior complexidade de confecção, associada aos procedimentos de imobilização que muitas vezes são realizados de forma dispendiosa. O uso de mediadores pode ser uma estratégia muito útil para uma melhora na transferência de elétrons com o eletrodo.⁶³ Entretanto, com a introdução de uma segunda espécie na superfície do eletrodo, pode ocorrer problemas no que concerne à dificuldade de uma segunda imobilização sem que haja prejuízo de uma primeira. Bem como, problemas relacionados a estabilidade e toxicidade do mediador ou ainda problemas relativos a lixiviação ou difusão destes mediadores.

Os eletrodos enzimáticos do tipo MET podem ser divididos em dois grupos: a espécie mediadora difusa no meio e a imobilizada sobre a superfície do eletrodo. Entretanto, eletrodos com mediadores difusos apresentam aplicações práticas limitadas, sendo mais comum o uso de mediadores imobilizados, principalmente, em aplicações como na área de células a biocombustível.⁷⁶

Uma vez que a utilização de mediadores redox pode apresentar uma estratégia viável para o desenvolvimento de uma comunicação elétrica eficiente entre a enzima e a superfície do eletrodo, a estabilidade da atividade deste eletrodo é fundamental para a aplicação em células a combustível. Uma vez que esta estabilidade pode ser gravemente afetada pela lixiviação do mediador para o meio, sendo imprescindível que a estratégia de imobilização seja eficiente.

Outro componente importante, amplamente investigado como material para a modificação de eletrodos para aplicações como eletrocatalisadores e bioeletrocatalisadores, são os nanotubos de carbono (CNTs). Nanotubos de carbono apresentam a habilidade em imobilizar uma grande concentração de catalisadores redox, como enzimas e espécies

moleculares,⁷⁵ e por sua alta eficiência na transferência de elétrons, tem feito deste nanomaterial uma importante opção para o design de eletrodos para uso em eletrocatalise.⁷⁵

A funcionalização de CNTs para a imobilização de eletrocatalisadores moleculares como complexos metálicos e enzimas, tem sido amplamente estudados por uma grande variedade de técnicas covalentes ou não covalentes.⁷⁷ As funcionalizações não covalentes são baseadas na forte interação pi-pi entre grupos pirenos e as paredes dos nanotubos de carbono. No caso das enzimas, esta funcionalização pode ocorrer através da imobilização de enzimas redox por derivados de pirenos previamente imobilizados nas paredes dos CNTs.^{78;79}

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é a confecção de uma célula híbrida a biocombustível de glicose/O₂, pela combinação do cátodo modificado com as nanopartículas cúbicas de paládio e um bioanodo enzimático modificado com GDH e mediadores redox especialmente desenvolvido para este propósito. Para isso será sintetizado PdNPs com diferentes tamanhos para avaliação eletrocatalítica frente a reação de redução de oxigênio através da modificação de eletrodos com as PdNPs e nanotubos de carbono.

Neste sentido, algumas metas foram estabelecidas:

3.1. METAS

- Sintetizar nanopartículas cúbicas de paládio com diferentes tamanhos e caracterizá-las por TEM, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), espectrometria dispersiva de raios-X (EDS), difração de raios X em pó (XRPD) e espectroscopia de absorção atômica, (AAS);
- Modificação de eletrodos de GC com MWCNTs e PdNPs, e a caracterização deste nanocompósito por microscopia eletrônica de varredura (SEM), e por técnica voltamétrica;
- Avaliação da capacidade catalítica das PdNPs frente a ORR em uma ampla faixa de pH e sob diferentes quantidades de Pd;
- Estudo da estabilidade temporal e sob condições de trabalho dos eletrodos a base de MWCNTs e PdNPs;
- Desenvolvimento de um bioanodo enzimático através da dupla funcionalização de MWCNTs com enzima GDH e possíveis quinonas como a antraquinona 2-sulfonato de sódio (AQS), a 9,10-fenantrenoquinona (PQ) , a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ) como mediadores redox;
- Aplicação do catodo a base de MWCNTs/PdNPs com o bioanodo a base de MWCNTs/quinona GDH para a construção de uma célula híbrida a biocombustível de glicose/O₂ completa.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção será descrito os materiais, técnicas, compostos e outras metodologias empregadas neste trabalho que foi desenvolvido em colaboração entre o Laboratório de Catálise Biomimética (Florianópolis/ Universidade Federal de Santa Catarina) e no grupo *Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques* (Grenoble/ CNRS - Université de Grenoble).

4.1. REAGENTES E SOLVENTES

A polivinilpirrolidona (PVP, MW $\sim 55000 \text{ g mol}^{-1}$), o L-ácido ascórbico, o brometo de potássio, o tetracloropaladato(II) de potássio, a antraquinona 2-sulfonato de sódio (AQS), a 9,10-fenantrenoquinona (PQ), a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ), o ácido *N*-hidroxisuccinimida-1-pireno butírico ester (pirNHS), a glicose desidrogenase NAD-dependente, (*pseudomonas* sp., E.C.: 1.1.1.47) (GDH), NDAH e NAD^+ foram obtidos da Sigma Aldrich e utilizados como recebidos sem nenhuma purificação prévia. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) (9,5 nm de diâmetro, com pureza $>95\%$) foram obtidos da Nanocyl. A GDL (Camada de Difusão de Gases) foi obtida da *Paxi Tech, Fuel Cells and Technologies*, Grenoble, França. A membrana SPectra/Por@ CE (Ester de celulose) MWCO: 100 Da foi obtida da Spectrum Labs e utilizada para os testes da célula a combustível completa.

Para as sínteses das nanopartículas metálicas foi utilizada água deionizada com resistividade de $18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}$. As soluções tampões (*Britton-Robinson* e *McIlvaine*) foram preparadas utilizando H_3BO_3 , H_3PO_4 , CH_3COOH , KOH , Na_2HPO_4 e ácido cítrico obtidos da Sigma Aldrich. Para o experimento de cronoamperometria simultânea para verificação de formação de H_2O_2 , foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio 30%, obtido da Sigma Aldrich.

4.2. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram adquiridas em um microscópio JEM-1011 TEM operado a 100 kV e as imagens de alta resolução e raio-X de energia dispersiva (EDS) foram retiradas de um Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-2100 TEM operado a 200 kV, que encontra-se disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), nas dependências da UFSC. Para as análises, uma alíquota das amostras dispersas em etanol foi depositada em um grid de cobre recoberto com filme de carbono de 400 mesh, deixado secar naturalmente. Os tamanhos médios das arestas das nanopartículas cúbicas de paládio foram obtidas através das medidas de pelo menos 200 partículas, resultando na medida de pelo menos 400 arestas.

A verificação da distribuição das PdNPs depositadas na superfície dos nanotubos de carbono foi verificada por Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM) em um microscópio QUANTA FEG 250, disponível no *Institut de Chimie Moléculaire* de Grenoble (ICMG). As imagens foram obtidas em modo de detecção de elétrons secundários e retro-espalhados para obtenção de informações tanto da topografia quanto composição química das amostras, respectivamente.

A Difração de Raios X em Pó (XRPD) das nanopartículas metálicas foram realizadas em um difratômetro Xpert Multipurpose utilizando radiação Cu K α e um detector Xcelerator, disponível no Dep. de Física da UFSC. Já para o tratamento dos dados de difração de raio-X e cálculo do tamanho médio dos cristais, foi utilizado TOPAS versão 4.2 da Bruker.

A quantificação de paládio nas amostras das nanopartículas foi medido por Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS) em espectrofotômetro Hitachi Z-8230 disponível na Central de Análises no Departamento de Química da UFSC. Para isso, as PdNPs foram solubilizadas em uma mistura de HCl e HNO₃ (3:1, em volume), e diluídas com água deionizada.

As caracterizações dos eletrodos foram realizadas em uma célula eletroquímica em um sistema de três eletrodos, sendo um fio de platina como contra eletrodo, e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl_{sat}) como eletrodo de referência, utilizando um potenciostato Autolab e software Nova.

Para a construção da célula a biocombustível foi utilizado um tubo e uma lâmina de polimetilmetacrilato unidos por parafusos e um anel de borracha para formar um reservatório. Um orifício com 5 mm de diâmetro na lâmina permitiu que o eletrodo fabricado com a camada de difusão de gás (GDL) contendo as PdNPs ficasse diretamente exposta ao ar.

4.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS CÚBICAS DE PD COM TAMANHO CONTROLADO

A síntese das PdNPs foi realizada por redução química do sal metálico de paládio (K_2PdCl_4) na presença do agente estabilizante (PVP) em água previamente deionizada. A síntese das PdNPs cúbicas seguem metodologias já descritas na literatura⁴¹, segundo Figura 8.

Para as PdNPs cúbicas, o agente estabilizante (PVP, MM = 55.000), o agente redutor (L-ácido ascórbico) e KBr foram solubilizados em água deionizada a temperatura ambiente. A solução foi então colocada em um balão de duas bocas (equipado com um condensador) e aquecido em banho de óleo a 80°C por 5 min. Enquanto isso, a solução estoque de Pd foi preparada pela solubilização do tetracloropaladato(II) de potássio (K_2PdCl_4) em 3 mL água deionizada a temperatura ambiente, que foi injetada ao meio reacional com auxílio de uma seringa, mantendo a reação sob agitação magnética a 80°C por 3h, nas condições descritas na Tabela 1, em um volume total de 11 mL. Com o objetivo de remover o excesso de PVP e outras moléculas, as PdNPs foram então lavadas com acetona/etanol e precipitadas por centrifugação a 500 rpm por 30min. O sólido resultante foi, naquele momento, seco sob pressão reduzida com auxílio de um rota evaporador.

Para o cálculo do tamanho médio final das nanopartículas, foi realizado o ajuste gaussiano dos histogramas das medidas das arestas dos nanocubos através das micrografias obtidas por TEM.

Figura 8. Esquema sintético das nanopartículas cúbicas de paládio.

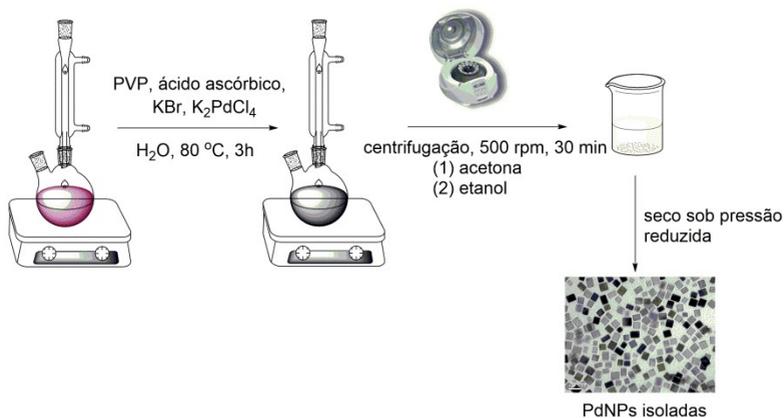


Tabela 1. Concentrações iniciais dos reagentes na reação de síntese de nanopartículas cúbicas de paládio

Reagente	Massa, g	Concentração, mol L^{-1}
PVP (MM = 55.000)	0,105	0,086
L-ácido ascórbico	0,060	0,031
KBr	0,300	0,23
K_2PdCl_4	0,065	0,018

A síntese para a obtenção de nanopartículas cúbicas de Pd com diferentes tamanhos foi realizada através da adição de HCl concentrado diretamente ao meio reacional, previamente à adição da solução estoque de K_2PdCl_4 . Além da síntese descrita acima, foram realizadas três outras sínteses, seguindo as mesmas condições reacionais descritas na tabela 2, com adição de diferentes quantidades de ácido clorídrico concentrado em cada uma delas, segundo a tabela 3.

Tabela 2. Concentrações iniciais de HCl na reação de síntese de nanopartículas cúbicas de paládio.

Síntese	[HCl], mmol L ⁻¹
2	3,3
3	6,6
4	11,0

4.4. PREPARAÇÃO DOS CÁTODOS COM PDNP

Os cátodos para a reação de redução de oxigênio (ORR) foram confeccionados utilizando a técnica de deposição de camada sobre camada dos nanotubos de carbono e das nanopartículas cúbicas de paládio. Para isso, foi preparada uma dispersão de 2,5 mg dos MWCNT em 1 mL de *N*-metilpirrolidona (NMP), sob banho ultrassônico durante 5 min por 3 vezes, para a formação de uma suspensão homogênea preta. Uma alíquota de 20 µL desta dispersão dos MWCNT foi depositada sobre a superfície do eletrodo e seca sob vácuo. Sobre a camada dos MWCNT, foi então depositado alíquotas de uma suspensão de 4 mg das PdNP em 1 mL de NMP, posteriormente secas sob vácuo. A quantidade de PdNP depositadas sobre o eletrodo foi alternada variando o volume da alíquota depositada, isso porque foi levado em consideração a quantidade de paládio presente em cada amostra das PdNP cúbicas, previamente determinada por espectroscopia de absorção atômica. Este procedimento foi utilizado para o preparo dos catodos, tanto dos eletrodos de carbono vítreo (GC) (Figura 9), quanto dos eletrodos respirantes com GDL.

Figura 9. Esquema de preparado dos eletrodos modificados com MWCNT/PdNPs, sobre os eletrodos de carbono vítreo.



4.5. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS CÁTODOS COM PDNP

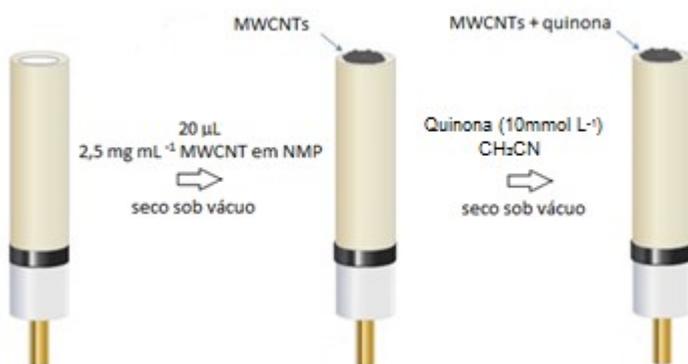
A caracterização do cátodo com PdNP/MWCNT depositado em eletrodo de carbono vítreo, foi realizada por técnica de voltametria cíclica, em solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, saturada com Ar (10 min sob fluxo contínuo), com velocidade de varredura de 10 mVs⁻¹, sob temperatura ambiente, em duas janelas eletroquímicas distintas, de 0,65 V a 0,2V, e de 1,2 V a -0,2 V vs. Ag/AgCl. Para o cálculo da superfície do eletrodo recoberta com as PdNPs imobilizadas (Γ_{PdNPs}), foram realizadas voltametrias cíclicas, nas mesmas condições descritas acima, com velocidades de varredura de 10, 50, 100 e 200 mVs⁻¹.

Para a investigação da capacidade catalítica das PdNPs frente a reação de redução de oxigênio, foram realizadas voltametrias cíclicas na faixa de pH de 2,0 a 12,0, em condições de saturação de O₂ no meio, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Utilizaram-se soluções tampão Britton-Robinson (BR) como eletrólitos para uma ampla faixa de pH. As soluções tampões de BR foram preparadas a partir de uma mistura de CH₃COOH (0,1 mol L⁻¹), H₃PO₄ (0,1 mol L⁻¹) e H₃BO₄ (0,1 mol L⁻¹), na faixa de 2 < pH < 12, sendo que o pH foi ajustado por titulação com solução aquosa de KOH (0,5 mol L⁻¹).

4.6. MODIFICAÇÃO DOS MWCNTS COM OS MEDIADORES REDOX

A funcionalização dos MWCNTs depositados sobre a superfície dos eletrodos de carbono vítreo com as respectivas quinonas, para a electrocatálise da reação de oxidação da NADH, ocorreu da seguinte forma: foi preparada uma dispersão de 2,5 mg dos MWCNT em 1 mL de N-metilpirrolidona (NMP), sob banho ultrassônico durante 5 min por 3 vezes, para a formação de uma suspensão homogênea preta. Uma alíquota de 20 μL desta dispersão dos MWCNT foi depositada sob a superfície do eletrodo e seca sob vácuo. Em seguida, os eletrodos foram incubados em uma solução de concentração igual a 10 mmol L^{-1} em CH_3CN da relativa quinona (AQS, PL e PLQ), por 1h. Após, os eletrodos foram vigorosamente rinsados com CH_3CN e água deionizada, e por fim deixados secar naturalmente conforme Figura 10.

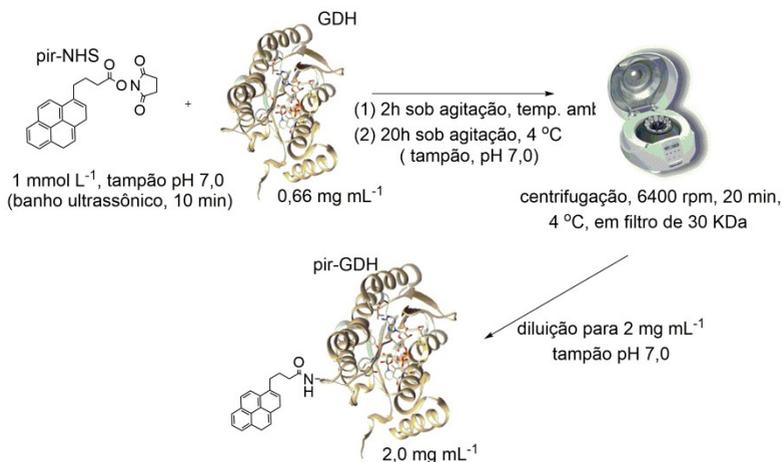
Figura 10. Esquema de preparado dos eletrodos de carbono vítreo a base de MWCNT modificados com mediadores redox.



4.7. PREPARAÇÃO DOS BIOÂNODOS BIFUNCIONALIZADOS MODIFICADOS COM GDH E PLQ

A inserção de um grupo pireno na glicose desidrogenase NAD-dependente (GDH) foi realizada da seguinte maneira: preparou-se uma solução 1 mmol L^{-1} de ácido N-hidroxissuccinimida-1-pireno butírico ester em tampão de *McIlvaine* $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em banho ultrassônico por 10 min, seguido da adição de GDH na concentração final de $0,66 \text{ mg mL}^{-1}$, mantendo sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 2 horas, e, posteriormente por mais 20 h a 4°C . A solução esbranquiçada resultante foi então centrifugada utilizando um filtro pra centrífuga de 30kDa (Amicon ultra-0,5) a 6400 rpm por 20 min, a 4°C . O sobrenadante resultante foi diluído em tampão de *McIlvaine* (pH 7,0) para a obtenção de uma solução com concentração de GDH modificada com grupo pireno com concentração final de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (conforme esquema na Figura 11), sendo esta enzima denotada como pir-GDH.

Figura 11. Esquema do preparo da GDH modificada com grupo pireno (pir-GDH).



Para o preparo do bioânodo, foi depositado 20 μL de uma suspensão de 2,5 mg mL^{-1} de MWCNT em NMP sobre a superfície do eletrodo (GC), para a formação de uma camada de nanotubos de carbono. Posteriormente, a superfície do eletrodo com os nanotubos de carbono foi recoberta através do gotejamento de uma solução de PLQ 10 mmol L^{-1} em CH_3CN , e após foi vigorosamente rinsada com CH_3CN , água deionizada e deixado secar naturalmente. Em seguida, foi feita a modificação do eletrodo com 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ), esse foi funcionalizado com a enzima glicose desidrogenase pela incubação durante aproximadamente 12 h com 40 μL de uma solução 2,0 mg mL^{-1} de pir-GDH em solução tampão de *Mcllvaine* pH 7,0 a 4°C (Figura 12), sendo que antes do uso os eletrodos foram rinsados rigorosamente com água deionizada e mantidos em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0) a temperatura ambiente.

Figura 12. Esquema da bifuncionalização dos MWCNT com PLQ e pir-GDH, sobre a superfície dos eletrodos de carbono vítreo.



4.8. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS BIOÂNODOS MODIFICADOS

A caracterização dos bioânodos modificados com MWCNT/PLQ/pir-GDH foi realizada por técnica de voltametria cíclica, em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0), sob diferentes velocidades de varredura (5, 10, 20 e 50 mVs^{-1}), sob temperatura ambiente, com varreduras de -0,1 a -0,7 V vs. Ag/AgCl. A capacidade electrocatalítica para a oxidação de NADH foi realizada por voltametria cíclica, com adição de 2 mmol L^{-1} de NAD^+ , em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0), com adição de 50 mmol L^{-1} de glicose ao meio, e através de cronoamperometria sob o potencial relativo ao pico anódico somado 50 mV ($E = E_{\text{pa}} + 50 \text{ mV}$), vs.

Ag/AgCl, com adições gradativas de glicose ao meio, na faixa de concentração final de 0 a 100 mmol L⁻¹.

4.9. CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA HÍBRIDA A BIOCOMBUSTÍVEL

Os experimentos com a célula híbrida a biocombustível foram realizados em uma célula de polimetilmetacrilato no formato de um reservatório (Figura 13), que através de um orifício na parte da extremidade inferior permite ao eletrodo modificado com as PdNPs a exposição ao ar atmosférico. O eletrodo construído com a GDL, além de permitir a passagem do ar atmosférico para o interior da célula, por ser constituído de um material extremamente hidrofóbico, auxilia na contenção da solução em seu interior. Todos os experimentos foram realizados em 5 mL de solução tampão de McIvaine (pH 7,0) contendo 2 mmol L⁻¹ de NAD⁺ e 50 mmol L⁻¹ de glicose a temperatura ambiente. A caracterização da célula híbrida a biocombustível foi primeiramente caracterizada por voltametria de varredura linear, com velocidade de varredura de 1,0 mV s⁻¹. Através dos potenciais medidos pelas correntes aplicadas, foram geradas curvas de polarização e potência para a análise da performance da célula híbrida a biocombustível.

Figura 13. Esquema da célula de polimetilmetacrilato utilizado para a caracterização da célula híbrida a biocombustível. (para melhor visualização o esquema mostra a célula na posição invertida)



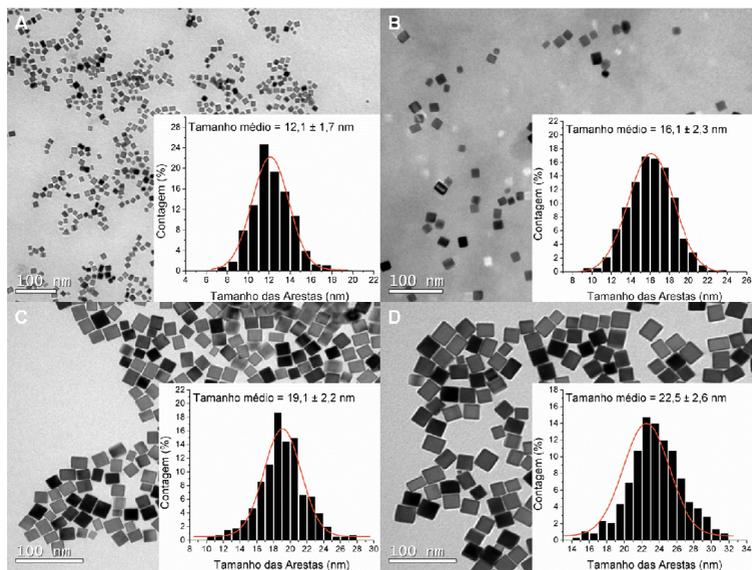
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CÚBICAS DE PALÁDIO

A síntese das nanopartículas cúbicas de paládio ocorreu utilizando K_2PdCl_4 como precursor metálico, ácido ascórbico como agente redutor, PVP como agente estabilizante e KBr como agente passivador de superfície, seletivo para a obtenção de faces (100) na superfície dos cristais de Pd.^{41; 55} A avaliação morfológica das nanopartículas ocorreu através da análise por TEM (figura 14), confirmando a obtenção de nanopartículas cúbicas com alto rendimento morfológico, que pode ser observado pela baixa incidência de nanopartículas com formas distintas, para todas as sínteses realizadas. Também foi verificado que mesmo após as nanopartículas serem isoladas do meio reacional, em um processo de precipitação por centrifugação, sua morfologia se manteve inalterada, pois todas as micrografias apresentadas são referentes às amostras obtidas após o processo de precipitação, sendo que para isso as amostras foram dispersas em etanol, resultando na estreita faixa de tamanho final, que pode ser verificada pelo erro relativo obtido (Figura 14).

O controle do tamanho das nanopartículas se deu pelo uso de uma metodologia que possibilitasse além do controle do tamanho final, a manutenção de suas formas geométricas, de forma definida e em alto rendimento. Isto ocorreu pelo controle cinético do processo de redução do sal de paládio com adição de HCl ao meio reacional em um processo de corrosão oxidativa ácida,^{41; 57; 80} mediante a manipulação da velocidade de nucleação, levando a uma diminuição do número de núcleos formados, e com isso um aumento no tamanho final das partículas para uma mesma concentração inicial de sal metálico precursor.

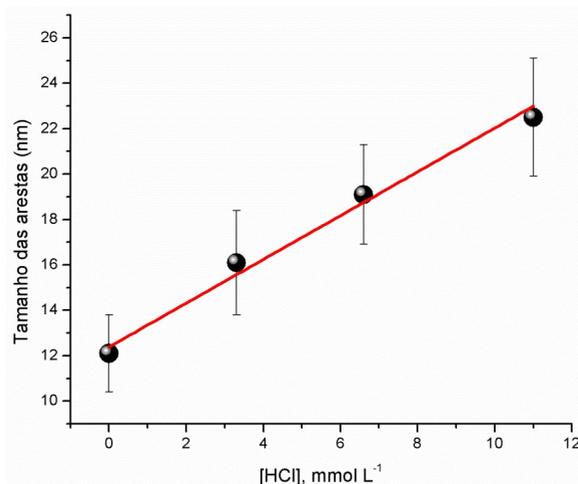
Figura 14. Imagens de TEM e respectivos histogramas dos nanocubos de paládio preparados na presença de diferentes concentrações de HCl: (A) 0, (B) 3,3, (C) 6,6 e (D) 11,0 mmol L⁻¹.



A determinação da quantidade de HCl a ser adicionada em cada síntese, sem que o controle sobre a forma final das nanopartículas fosse prejudicado, foi realizado de forma experimental, por meio de alguns experimentos preliminares, sendo observado que o excesso do ácido ao meio leva a uma perda no controle morfológico.

Estes testes preliminares foram cruciais para estabelecer uma faixa de concentração ótima de ácido clorídrico, em que a forma cúbica das nanopartículas fosse mantida ao passo que ocorresse o aumento do médio final dos cristais. Foi observado que o tamanho médio das PdNPs cúbicas aumentaram linearmente com o aumento da concentração de HCl, de 0 até 11,0 mmol L⁻¹, conforme Figura 15.

Figura 15. Gráfico do tamanho médio das PdNPs cúbicas em função das concentrações de HCl utilizadas nas sínteses, com o devido ajuste linear ($R^2 = 0,9908$).



O uso de nanopartículas metálicas como catalisador em reações químicas requer que haja a quantificação do metal no catalisador para a sua futura aplicação. Este tipo de quantificação nem sempre é possível devido à complexidade envolvida no processo de síntese de catalisadores nanométricos. Neste trabalho adotou-se a estratégia de isolar as nanopartículas do meio reacional por processo de precipitação seguido de lavagem com solventes adequados. Esta estratégia baseia-se no princípio de que apenas a forma de Pd zero valente possa ser precipitada, sendo que qualquer resquício de Pd⁺² que possivelmente não foi reduzido na sua totalidade durante o processo, permaneça em solução.

Então, depois de isoladas, a concentração de Pd nas PdNPs foi determinada por Espectroscopia de absorção atômica (AAS) apresentando um percentual de Pd que variou de 35,3 a 53,6 % de Pd sobre a massa isolada, conforme Tabela 3. Levando em consideração que todo o Pd isolado seja referente às nanopartículas.

Tabela 3. Percentual de Pd nas amostras de PdNPs isoladas.

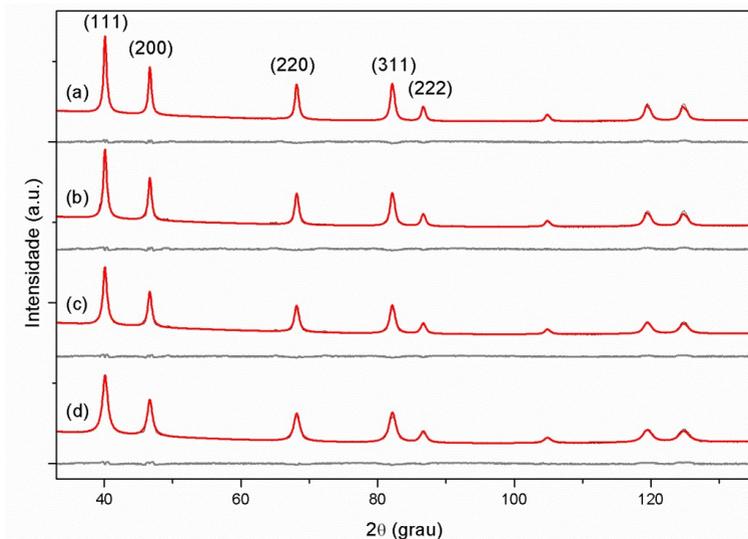
Síntese	[HCl], mmol L ⁻¹	PdNPs (nm)	% Pd
1	-	12,1 ± 1,7	53,6
2	3,3	16,1 ± 2,3	37,8
3	6,6	19,1 ± 2,2	48,8
4	11,0	22,5 ± 2,6	35,3

Outra vantagem quanto ao isolamento das PdNPs do meio reacional é a possibilidade de avaliar as suas estruturas cristalinas por difração de raios X em pó. Através da XRDP foi possível constatar que todas as amostras apresentam alto grau de cristalinidade, evidenciado pelos padrões de difrações obtidos (Figura 16). Os cinco picos característicos correspondentes com as reflexões atribuídas para (111), (200), (220), (311) e (222), em cerca de $2\theta = 40^\circ, 46^\circ, 68^\circ, 82^\circ$ e 86° respectivamente, correspondem a uma estrutura cristalina de paládio do tipo cúbica de face centrada (*fcc*), (*Fm3m* e $a = 3,889 \text{ \AA}$).⁸¹ Os parâmetros de rede obtidos através do refinamento da estrutura usando o método de Rietveld para as nanopartículas cúbicas de Pd sintetizados com diferentes concentrações de HCl, 0, 3,3, 6,6 e 11 mmol L⁻¹ foram de 3,8882 Å, 3,8895 Å, 3,8897 Å e 3,8900 Å, respectivamente.

Através dos valores das intensidades relativas dos picos de maior intensidade do difratograma, foi possível realizar o cálculo do tamanho médio dos cristalinos, por meio da equação de Scherrer.⁸² Os valores calculados estão de acordo com os valores obtidos por TEM, sendo eles 13,9, 18,8, 22,6 and 27,3 nm.

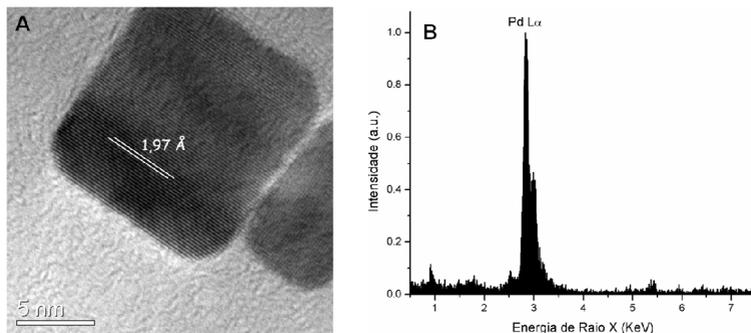
Quando comparado a razão entre as intensidades relativas dos picos (200) e (111) ($I_{(200)}/I_{(111)}$) dos difratogramas, é observado que para todas as nanopartículas de diferentes tamanhos, os valores encontrados de 0,93, 0,91, 0,87 e 0,73 referente as nanopartículas de 22,5, 19,1, 16,1 e 12,1 nm, respectivamente, são todos superiores ao valor encontrado para a amostra em pó convencional com valor de $I_{(200)}/I_{(111)} = 0,42$. Isto indica que os nanocubos de Pd são primariamente compostos por planos (100)⁸¹ sendo que os valores de $I_{(200)}/I_{(111)}$ diminuem na mesma ordem em que o tamanho das PdNPs diminuem, evidenciando um aumento da razão relativa aos planos (100) na medida em que o nanocubo diminui.

Figura 16. Difratograma de XRPD experimental (linhas vermelhas), calculado (linhas pretas) e a diferença entre o experimental e calculado, das PdNPs, (a) 22,5 nm, (b) 19,1 nm, (c) 16,1 nm e (d) 12,1 nm.



A cristalinidade da amostra também foi verificada por imagem de HRTEM de uma única partícula (Figura 17A), referente às PdNPs cúbicas de tamanho médio de 12,1 nm. Por intermédio da micrografia de alta resolução é possível verificar a presença de planos cristalinos contínuos na superfície da nanopartícula que apresenta um espaçamento interplanar de $1,97\text{\AA}$, consistente com um parâmetro de rede cristalina do tipo *fcc* (cúbico de face centrada) para o Pd,²⁰ correspondente a uma face do tipo Pd(100)⁸³. Também foi possível verificar a presença de Pd, pela análise de EDS (Figura 17B), que apresenta uma composição química qualitativa da amostra, evidenciando o Pd como elemento majoritário constituinte da nanopartícula.

Figura 17. (a) Imagem de HRTEM e (b) Espectro de EDS HRTEM das PdNP de $12,1 \pm 1,7$ nm.



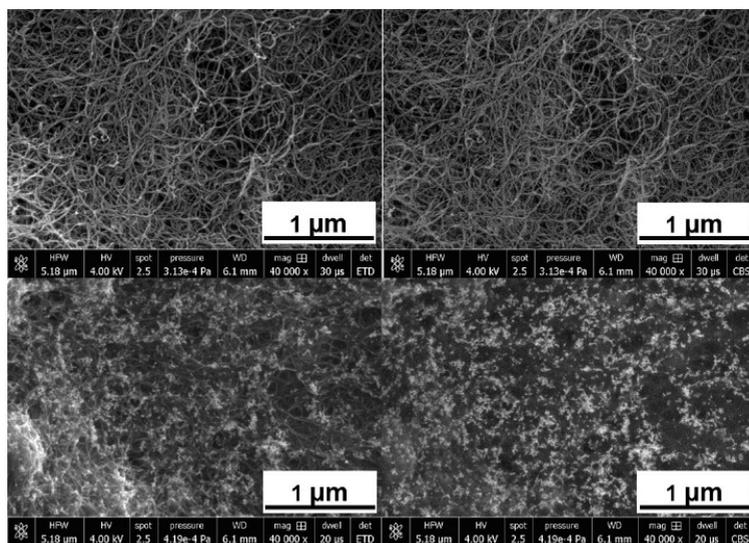
5.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROQUÍMICA DOS COMPÓSITOS DE PDNP/MWCNT

Com o objetivo de modificar eletrodos com PdNPs para aplicação na reação de redução de oxigênio, as nanopartículas de Pd foram suportadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs). A escolha se deu pois este é um material conhecido por possuir alta condutividade elétrica⁷⁵, sendo um bom candidato para modificação com nanopartículas metálicas. Também é importante mencionar o fato de que o manuseio dos MWCNT é mais fácil quanto comparado com os nanotubos de carbono de paredes únicas (SWCNTs), referente ao seu empacotamento no material, dispersão e pureza.⁷⁵

A avaliação da distribuição das PdNPs sobre a superfície dos nanotubos de carbono depositados na forma de camadas subsequentes dos MWCNTs foi realizada por SEM, e as micrografias são apresentadas na Figura 18. Foi possível observar que a deposição dos MWCNT ocorreu uniformemente criando uma espécie de rede com os nanotubos de carbono e disponibilizando grande área para a modificação com as PdNPs. Quando o compósito dos MWCNT e PdNPs foi analisado sob o modo de detecção de elétrons retroespalhados, foi possível distinguir com clareza pela diferença de contraste na imagem, a distribuição das PdNPs, que são os pontos com brilho de maior intensidade, evidenciando uma distribuição uniforme e homogênea da cobertura das PdNPs sobre a superfície dos MWCNT, o que demonstrou que esta metodologia de preparo pelas deposições consecutivas de camada sobre camada é uma boa metodologia para a deposição dos nanocompostos sobre a superfície do eletrodo. Pois, como a reação de

redução de oxigênio ocorrerá na superfície das nanopartículas, é importante que estas não permaneçam concentradas em uma só região, mas sim por toda a superfície dos nanotubos de carbono, favorecendo a otimização da área do catalisador e maior contato com os MWCNTs, favorecendo a transferência de elétrons.

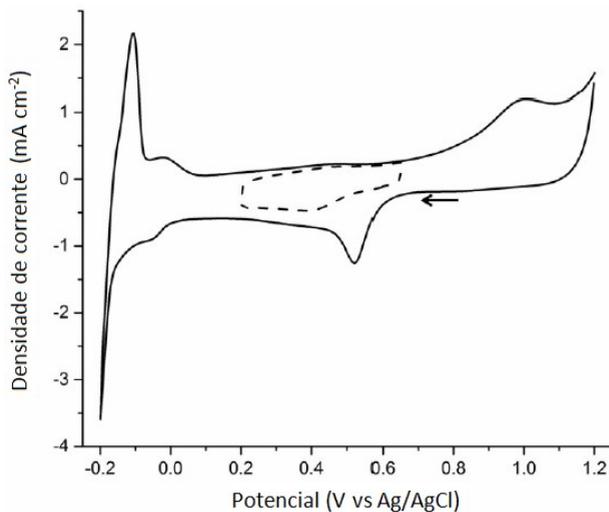
Figura 18. Imagem de SEM dos MWCNT (superior) e MWCNT com PdNPs (inferior). As imagens são referentes às mesmas áreas das amostras, utilizando diferentes modos de detecção, sendo (esquerda) no modo de detecção de elétrons secundários (*Everhart-Thorneley detector*; ETD) para a visualização em profundidade da camada de deposição dos MWCNT e (direita) utilizando modo de elétrons retroespalhados (*Circular Backscatter Detector*; CBS) para um melhor contraste da distribuição das PdNPs nos MWCNT.



O composto das PdNPs/MWCNT depositados sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo foi caracterizado por técnica de voltametria cíclica (CV) em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, como apresentado na Figura 19. Para o início da varredura, foi escolhido como ponto inicial da varredura o potencial de circuito aberto de $0,65 \text{ V}$. A primeira voltametria cíclica foi realizada em uma janela eletroquímica restrita, de $0,65 \text{ V}$ a $0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl , onde foi possível observar a ausência de sinais eletroquímicos. Entretanto, em uma janela eletroquímica maior ($1,2 \text{ V}$ a $-0,2 \text{ V}$), os picos característicos da região de adsorção/desorção de hidrogênio são evidenciados na região de $-0,2$ a $0,05 \text{ V}$. Quando o sentido da varredura é

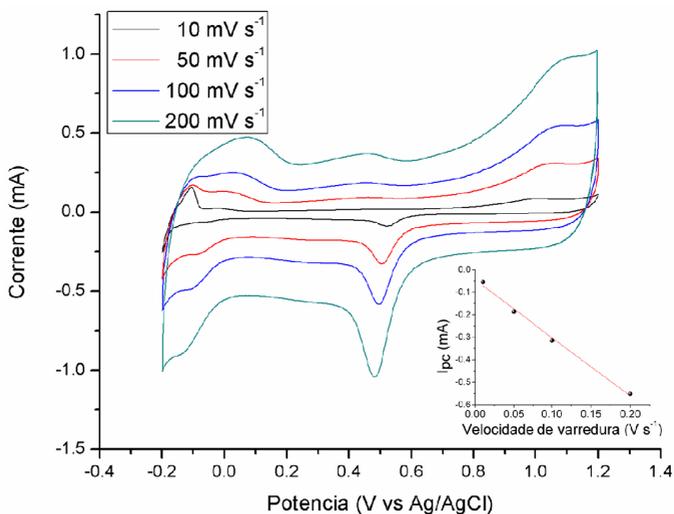
invertido, é possível observar um sinal de oxidação iniciando em torno de 0,8 V com máximo em 1,0 V, que corresponde a observações prévias encontradas na literatura, atribuídas a formação de hidróxido de paládio (PdOH) e óxido de paládio (PdO) na superfície do Pd depositado sobre o eletrodo.⁸⁴ Em uma segunda varredura é possível observar a presença de um novo pico de redução em torno de 0,5 V, que pode ser atribuído a redução desta camada de óxido de paládio anteriormente mencionada.

Figura 19. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo modificados com PdNPs/MWCNT em solução de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , a temperatura ambiente e saturado com Ar. Em uma janela eletroquímica restrita (tracejado) e estendida (linha), com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Estão representados apenas os terceiros ciclos de cada janela eletroquímica.



Os voltamogramas cíclicos também foram realizados sob diferentes velocidades de varreduras (figura 20), sendo que as correntes nos picos de redução são linearmente dependentes da velocidade de varredura aplicada (Figura 20 *inset*), confirmando assim que as interações entre as PdNPs depositadas sobre a superfície da camada de MWCNT apresentam boa estabilidade.

Figura 20. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono vítreo modificados com PdNPs/MWCNT em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a temperatura ambiente e saturado com Ar em diferentes velocidades de varredura. *Inset:* I_{pc} vs. velocidade de varredura.

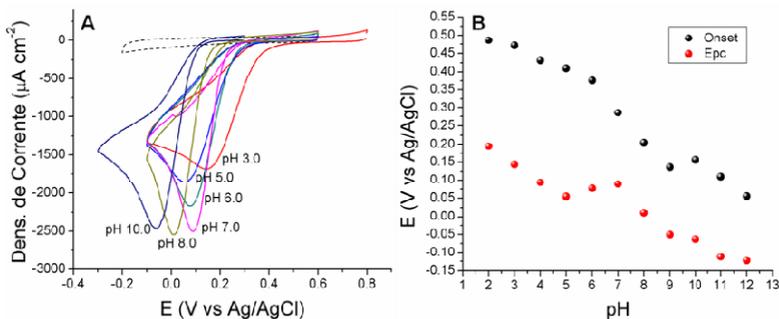


A superfície do eletrodo recoberta com as PdNPs imobilizadas (Γ_{PdNPs}) foi calculada de acordo com a equação de Laviron, $I_{pf} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT}$, onde n é o número de elétrons envolvidos no processo ($n = 2$), F é a constante de Faraday, A é a área da superfície do eletrodo, R é a constante dos gases, T é a temperatura, e v é a velocidade de varredura. O valor médio encontrado para a cobertura da superfície das PdNPs foi de $9,7 \pm 0,5 \text{ nmol cm}^{-2}$.

5.3. ESTUDO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO DE OXIGÊNIO PELOS ELETRODOS DE PDNP/MWCNT EM DIFERENTES VALORES DE PH.

A reação de redução de oxigênio, utilizando como catalisador as PdNPs cúbicas, foi investigada em ampla faixa de pH (de 2,0 a 12,0), por meio da técnica de voltametria cíclica em soluções tampões de *Britton-Robinson* saturados em O_2 (Figura 21A). Para este estudo, foram utilizadas as PdNPs cúbicas com tamanho médio de 12,1 nm, imobilizadas sobre a superfície dos MWCNT imobilizados em eletrodos de carbono vítreo.

Figura 21. (A) Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio realizados utilizando eletrodos de GC modificados com PdNPs/MWCNT sob argônio em solução tampão de *Britton-Robinson* (pH 5,0) (linha pontilhada) e saturado com O_2 em diferentes valores de pH (linhas sólidas), com velocidades de varreduras de 10 mV s^{-1} . (B) Valores de potenciais de início do processo de redução (*onset*) (preto) e picos de potenciais catódicos (Epc) (vermelho) para a reação de redução de O_2 sob diferentes valores de pH.



Foi possível observar que as PdNP cúbicas suportadas em MWCNT expuseram atividade frente a reação de redução de oxigênio em meio ácido, neutro e básico, sendo que em todos os pH estudados, os voltamogramas cíclicos não apresentaram nenhum sinal reversível. Na Figura 21B, são demonstrados os valores de *onset* em toda a faixa de pH, sendo que estes valores mudam em direção a valores negativos com um valor médio da inclinação de $-38 \pm 2,8 \text{ mV}$ por unidade de pH, enquanto os valores dos picos de potencial de redução variam em reação ao pH formando um espécie de platô na região com valores de pH próximos ao neutro (pH 5,0 a 7,0). Levando em consideração o ΔE entre os valores dos potenciais de início da

redução e dos picos potenciais, é possível observar que a eletrocatalise entre pH 7,0 e 12,0 seguem o mesmo comportamento cinético, baseado nos formatos dos sinais dos voltamogramas obtidos.

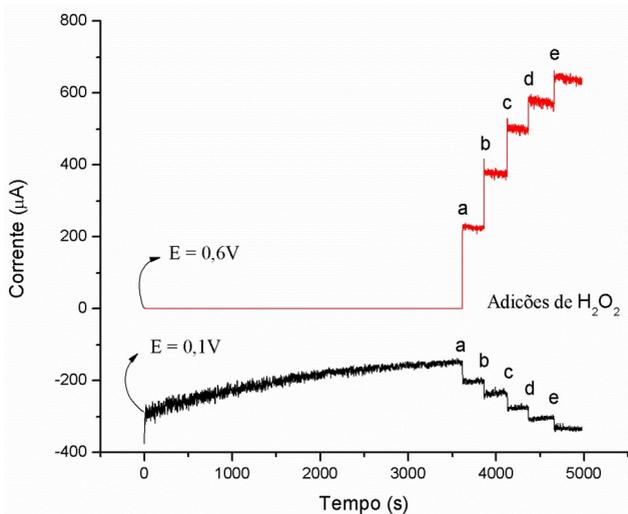
Já, para valores de pH < 7,0, é evidenciada uma diminuição da corrente eletrocatalítica entre pH 7,0 e 3,0, seguida de uma distorção progressiva nos voltamogramas com um aumento do sobrepotencial na medida em que o pH diminui, para a reação de redução de oxigênio. Muitos relatos mostram um aumento da atividade eletrocatalítica de partículas metálicas para a redução de oxigênio em meio alcalino. Isto pode ser explicado pelo decréscimo do efeito de envenenamento por ânions em meios básicos,¹⁵ que se ligam facilmente nas PdNPs, ocupando consequentemente os sites ativos para a adsorção de O₂ e quebra da ligação O-O, resultando em uma velocidade de reação menor para a reação de redução de oxigênio em meio ácido.

Levando em conta que os eletrodos contendo as PdNPs serão combinados com bioeletrodos enzimáticos para a formação de uma célula biocombustível híbrida, os demais experimentos foram realizados em pHs próximos a neutro, onde a maioria das enzimas são ativas para a oxidação de substratos.

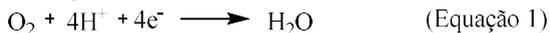
5.4. VERIFICAÇÃO DE FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO PRODUTO DA REDUÇÃO DE O₂.

Com o objetivo de determinar se a redução de oxigênio conduz a formação de água ou peróxido de hidrogênio como produto, realizou-se um experimento de cronoamperometria com medições simultâneas dentro de uma mesma célula eletroquímica (Figura 22). Aos eletrodos de PdNPs/MWCNT, foi aplicado um potencial de 0,1V (potencial no qual foi observado a redução de O₂) em relação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl para que ocorresse a redução de O₂. Simultaneamente, foi aplicado o potencial de 0,6 V em um eletrodo de Pt imerso na mesma célula eletroquímica com o objetivo de detecção de H₂O₂, caso este seja formado com produto da redução do oxigênio. Durante todo o experimento, foi mantida constante a purga de O₂, para garantir a condição de saturação de O₂ no eletrólito, sendo que a solução do eletrólito foi mantida sob agitação constante a aproximadamente 1000 rpm, com auxílio de um agitador magnético.

Figura 22. Medidas cronoamperométricas simultâneas dos eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT (PdNPs, 12,1 nm) (preto) com $E = 0,1$ V vs. Ag/AgCl e eletrodo de platina (vermelho) mantido a $E = 0,6$ V vs. Ag/AgCl em solução tampão de *McIlvaine* (pH 6,0), sob agitação constante de 1000 rpm a adições de H_2O_2 (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 e (e) 5 $mmol L^{-1}$.



Durante os primeiros 60 min, em que a cronoamperometria foi realizada, nas condições acima citadas, foi registrado uma corrente relativa à redução de oxigênio sobre o eletrodo modificado com as PdNPs/MWCNT, como esperado. Entretanto, não foi registrada nenhuma corrente oxidativa no eletrodo de Pt durante este período em que houve a redução contínua de O_2 . Após os 60 min (3600 s), adições sucessivas de H_2O_2 foram realizadas, gerando então uma corrente e consequentemente indicando a oxidação do peróxido em O_2 . Isto resultou na recuperação inicial de saturação de O_2 , mostrada pelo aumento da corrente de redução e sua estabilização para o valor inicial de $300 \mu A$ sobre o eletrodo com as PdNPs. Com isso pode ser concluído que a redução de oxigênio pelos eletrodos de PdNPs/MWCNT envolveu quatro elétrons, conforme a equação 1 e nenhuma formação de peróxido de hidrogênio no meio.



Este resultado é extremamente positivo, uma vez que a produção de H_2O_2 no meio poderia prejudicar o funcionamento do bioanodo enzimático (quando combinados para a construção da célula híbrida a biocombustível), pois peróxido de hidrogênio é uma espécie oxidante forte e pode ser prejudicial a componentes biológicos como enzimas.

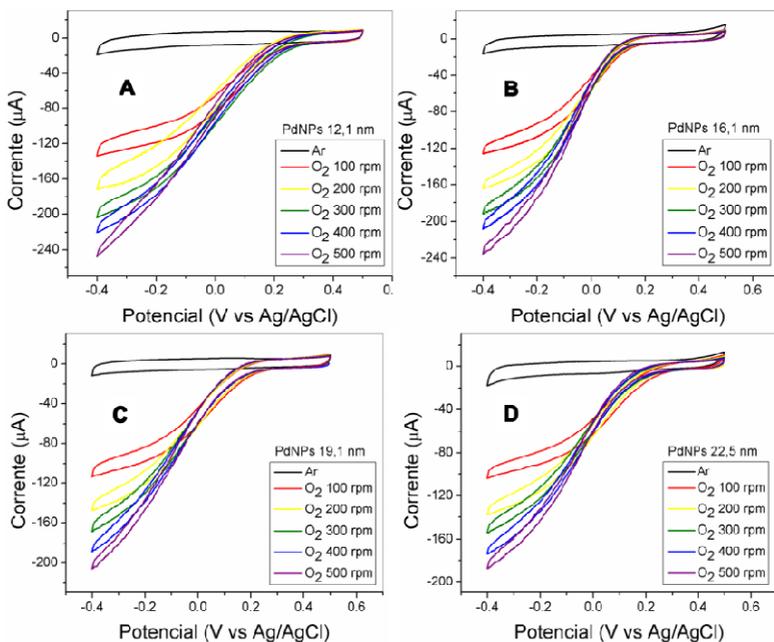
5.5. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DOS DIFERENTES TAMANHOS DE PDNPs CÚBICAS NA REAÇÃO DE REDUÇÃO DE OXIGÊNIO.

Os quatro diferentes tamanhos de nanopartículas cúbicas de paládio sintetizadas foram comparadas entre si utilizando eletrodos de disco rotatório (RDE), para o controle da espessura da camada de difusão próxima ao eletrodo. Isso permitiu que fosse possível a comparação direta entre os diferentes tamanhos das PdNPs e seu efeito na redução de oxigênio.

As quantidades de paládio referentes a cada amostra das nanopartículas metálicas foram depositadas de forma a serem as mesmas para todos os tamanhos das PdNPs, de acordo com os resultados obtidos por análise de absorção atômica das nanopartículas isoladas. A quantidade total de Pd na superfície dos eletrodos para o experimento foi de $200 \mu\text{g cm}^{-2}$.

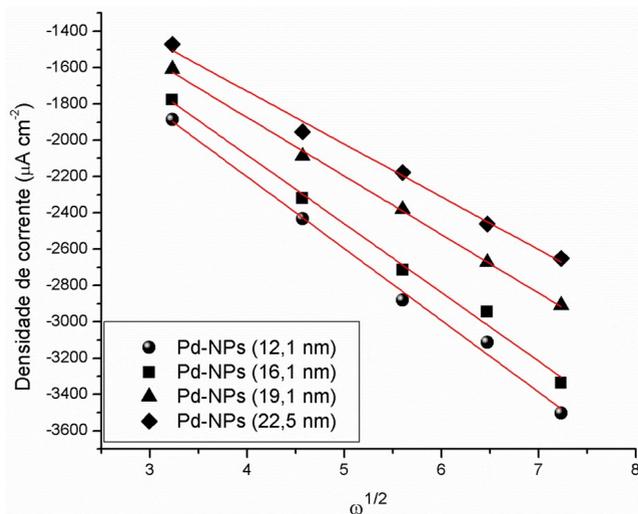
A comparação para a avaliação quanto ao tamanho das PdNPs foi realizada por técnica de voltametria cíclica nos RDE (Figura 23), e assim como já esperado, houve um aumento gradativo na corrente eletrocatalítica com o aumento da velocidade de rotação do eletrodo devido a redução da camada de difusão na superfície do eletrodo.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos para a reação de redução de oxigênio realizado usando eletrodos de disco rotativos modificados com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , sob argônio (preto) e saturado com O_2 (em cores), em diferentes velocidades de rotação, com as PdNPs (A) $12,1 \pm 1,7 \text{ nm}$, (B) $16,1 \pm 2,3 \text{ nm}$, (C) $19,1 \pm 2,2 \text{ nm}$, (D) $22,5 \pm 2,6 \text{ nm}$.



Também foi possível observar no gráfico da Figura 24, que através do gráfico de corrente vs. a raiz quadrada da velocidade de rotação existe uma correlação direta entre os diferentes tamanhos das PdNPs e as correntes electrocatalíticas da redução de oxigênio.

Figura 24. Correlação linear entre a corrente electrocatalítica e a velocidade de revolução para cada tamanho das PdNPs nos RDE modificados com PdNPs/MWCNT. Os valores de corrente foram extraídos dos experimentos de voltametria cíclica em -0,4 V (em solução tampão de *Mcllvaine* pH 6,0).



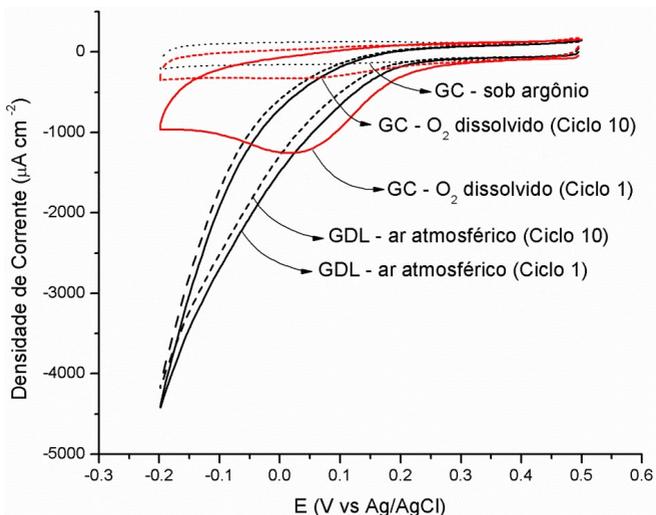
Com isso foi verificado que com a diminuição do tamanho das PdNPs, a corrente catalítica relativa à redução do oxigênio aumentou. Esta correlação pode ser atribuída ao aumento da área superficial das nanopartículas menores, mantendo-se constante para todos os casos a quantidade de Pd na superfície dos eletrodos. A correlação linear entre as correntes catalíticas e o tamanho das nanopartículas também demonstra uma perda proporcional aos seus tamanhos da área superficial ativa das nanopartículas. Observa-se isso, pois uma vez que para a imobilização das PdNPs na superfície dos MWCNT, parte de suas áreas superficiais não contribuem para a reação de redução de oxigênio, devido ao fato de estarem adsorvidas a superfície dos nanotubos de carbono.

5.6. ELETRODOS DE PDNPS/MWCNT PREPARADOS COM GDL E VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE PD

Foi observada uma grande limitação causada pela concentração e difusão de oxigênio sobre a superfície do eletrodo quando os eletrodos de carbono vítreo modificados com PdNPs/MWCNT são utilizados para a redução de oxigênio, em eletrólito com condições de oxigênio dissolvido. Com o objetivo de contornar estas limitações, foi optado pelo uso de eletrodos constituídos com uma camada de difusão de gases (GDL) para o suporte condutivo na fabricação de cátodos respirantes. Este tipo de cátodo permite que ocorra a redução de oxigênio diretamente da atmosfera, como alternativa para que não haja a necessidade de dissolução e difusão de oxigênio no eletrólito que pode ser reduzido diretamente da atmosfera sobre a superfície do cátodo.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 25 representam as diferenças entre os eletrodos funcionalizados de GC e GDL sob condições quiescentes, com $[O_2] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. É possível verificar que os potenciais onde se inicia a redução do oxigênio tanto nos eletrodos de GC e GDL aparentemente são muito similares. Entretanto, após sucessivas varreduras, é possível observar um contínuo decaimento na corrente catalítica para os eletrodos de GC modificados, enquanto se mantém constante nos eletrodos respirantes de GDL.

Figura 25. Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio utilizando eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) em velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} utilizando o eletrodo respirante de GDL (preto) e eletrodo de GC sob oxigênio dissolvido (vermelho) e eletrodo de GC não modificado sob argônio (pontilhado em preto).



Quando comparados os dois tipos de eletrodos, é possível observar que ocorre uma limitação relativa a difusão/concentração de O_2 nos eletrodos de GC que se encontram imersos dentro do eletrólito sem nenhuma convecção, pois a partir de sucessivas varreduras voltamétricas, a corrente referente a redução diminui drasticamente. É importante destacar também, o fato de que as correntes capacitivas são as mesmas para ambos os eletrodos, indicando que a área superficial eletroativa para os dois tipos de eletrodos são as mesmas.

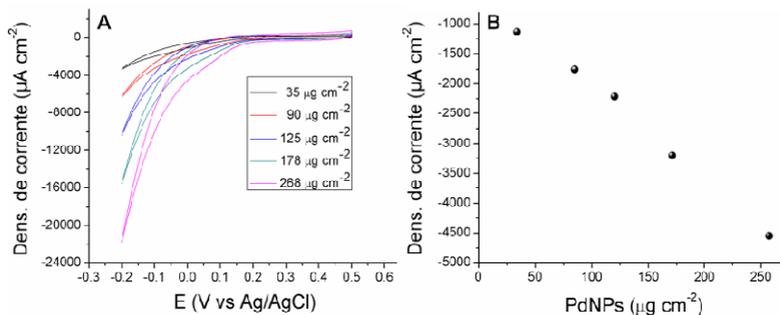
Para os eletrodos de GC, a corrente faradaica registrada durante a primeira e a décima varredura em $E = 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ foi de -1252 e $-327 \mu\text{A cm}^{-2}$ respectivamente, o que representa um decaimento significativo em torno de 74%. Entretanto, o eletrodo de GDL que se encontra em contato com o ar atmosférico, apresentou uma atividade eletrocatalítica maior que seu eletrodo homólogo de GC para a primeira varredura de $J_{\text{max}} = -1680 \mu\text{A cm}^{-2}$ em $E = 0,0 \text{ V}$, não apresentando a mesma perda significativa na varredura do potencial na região da redução de O_2 (perda de 14%). Esta comparação mostrou de forma inequívoca a vantagem apresentada em utilizar os eletrodos de GDL comparados com os eletrodos regulares de GC.

Vantagens estas que dizem respeito às limitações relativas à difusão/concentração de O_2 , e adicionalmente, vantagens quanto ao custo operacional do cátodo de GDL, pois não necessita de fonte alternativa de O_2 , utilizando oxigênio disponível na atmosfera.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de otimização da densidade de corrente utilizando o cátodo no modo respirante, a quantidade de PdNPs depositada sobre a superfície dos nanotubos de carbono foi variada, utilizando os cátodos constituídos com GDL. Para isso foram utilizadas as nanopartículas com tamanho médio de 12,1 nm, que demonstraram apresentar a melhor performance catalítica para a reação de redução de oxigênio. A quantidade de Pd sobre os eletrodos de GDL modificados com as PdNPs/MWCNT foi variada entre 35 e 268 $\mu\text{g cm}^{-2}$, através de quantidades de deposição diversificadas sobre o eletrodo alterado pelas MWCNTs. A densidade de corrente, apresentada na Figura 26, foi extraída de experimentos de voltametria cíclica a 0,0 V e velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Como esperado, o resultado revela um aumento linear da densidade de corrente eletrocatalítica com o aumento de Pd para as quantidades de paládio empregadas.

Como um dos objetivos da pesquisa em nanocatalisadores estruturados é a diminuição na quantidade de metal utilizada⁶, buscou-se o uso de uma quantidade reduzida de Pd sobre o cátodo. Foi, então, escolhida a quantidade de 125 $\mu\text{g cm}^{-2}$ de paládio como quantidade ideal para a sequência dos estudos.

Figura 26. Diferentes quantidades de PdNPs ($\mu\text{g cm}^{-2}$), (A) voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} e (B) cronoamperometria em $E = 0,0 \text{ V}$, em tampão de *McIlvaine* (pH 6,0), testados nos eletrodos de GDL-PdNPs/MWCNT, com as nanopartículas cúbicas de 12,1 nm.

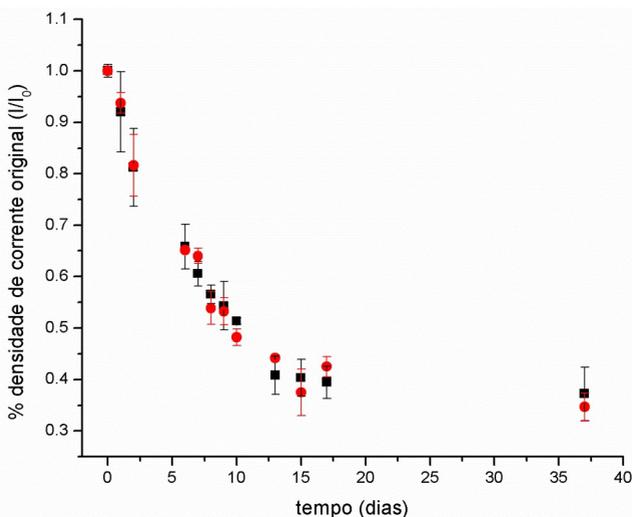


5.7. ESTABILIDADE DOS ELETRODOS DE GDL MODIFICADOS COM PDNPS/MWCNT

A estabilidade temporal dos eletrodos de GDL modificados com PdNPs/MWCNT foi determinada sob duas condições distintas de armazenamento dos eletrodos, em temperatura ambiente. A primeira delas, foi com os eletrodos armazenados a seco e expostos ao ar atmosférico que sempre foram deixados secar naturalmente após cada uso. Na segunda forma de armazenamento, os eletrodos foram mantidos imersos em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0), o mesmo eletrólito foi utilizado para a avaliação dos eletrodos.

Esta investigação referente à estabilidade temporal dos cátodos de PdNPs/MWCNT foi realizada através de voltametrias cíclicas, em que os valores das correntes foram monitorados com relação ao tempo no potencial relativo a 0,0 V (Figura 27), sempre em condições quiescentes de O₂.

Figura 27. Valores de corrente relativas (I/I_0) vs. tempo para diferentes condições de armazenamento a temperatura ambiente: expostos ao ar atmosférico (quadrados pretos) e em tampão de *Mcllvaine* (pH 6,0) (círculos vermelho). A corrente foi extraída de experimentos de voltametria cíclica em 0,0 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, sempre relativas à terceira varredura.

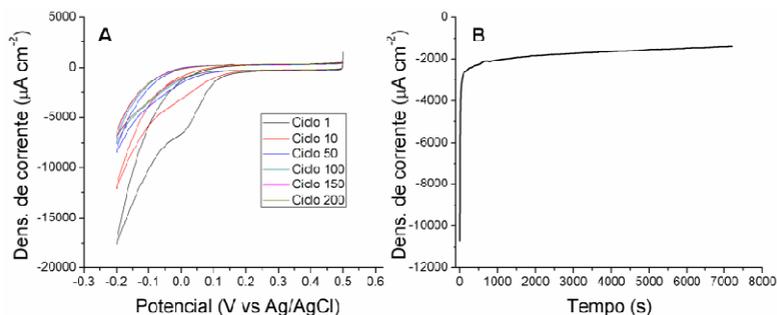


Foi possível observar que ambas as condições de armazenamento dos cátodos de GDL apresentaram um decaimento da corrente catalítica relativa à redução de oxigênio ao longo do tempo que perdurou o experimento. Este decaimento foi seguido de uma estabilização, que ocorreu em aproximadamente em 10 dias de monitoramento.

As correntes eletrocatalíticas remanescentes após 37 dias para os cátodos mantidos a seco e imersos em tampão das PdNPs/MWCNT foram de $40 \pm 4\%$ e $36 \pm 5\%$, respectivamente. Os resultados mostram que, sob ambas as condições, a estabilidade dos eletrodos são comparáveis. E ainda que a diminuição da corrente catalítica pode ser atribuída preferencialmente a um processo de envelhecimento natural das PdNPs. Provavelmente, as perdas das PdNPs ocorrem devido a um inchaço do polímero utilizado na estabilização das PdNPs.

Além disso, dois testes de estabilidade operacionais foram realizados utilizando as técnicas de voltametria cíclica (CV) e cronoamperometria (CA), ambas apenas sob condições de difusão de O_2 atmosférico pela camada de GDL (Figura 28), sendo que o eletrólito foi saturado previamente com oxigênio, antes do início do experimento.

Figura 28. (A) Voltamogramas cíclicos representativos para a reação de redução de oxigênio realizado utilizando eletrodo de GDL modificado com PdNPs/MWCNT em tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0) inicialmente saturado com O_2 , com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} e (B) Cronoamperometria utilizando eletrodo de GDL modificado com PdNPs/MWCNT, em tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0), em $0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.



O teste de voltametria cíclica – após 200 varreduras consecutivas de 0,4 até -0,2 V com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} que corresponde a 0,5 ciclos por minuto em ar atmosférico, em um total de 6,6 h de redução contínua de O_2 na superfície das PdNPs – resultou na diminuição de sua atividade, atingindo ao final 33% do seu valor original. No caso do experimento de cronoamperometria com o cátodo de GDL, o eletrodo foi

polarizado por 2 h, e após este período, a corrente catalítica resultante foi de cerca de 66% do seu valor inicial.

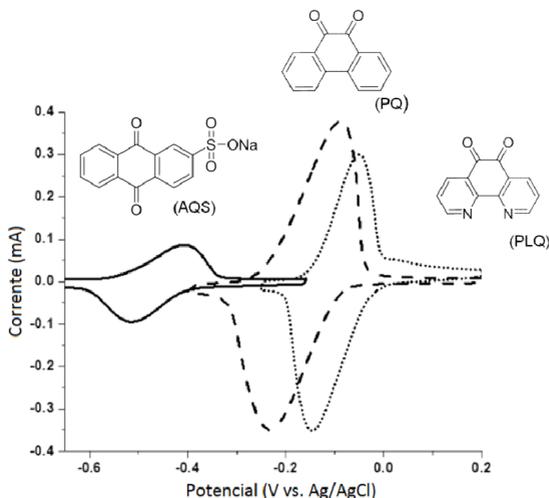
5.8. CONSTRUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO BIOÂNODO UTILIZANDO GDH NAD-DEPENDENTE

Como objetivo do trabalho foi construir uma célula híbrida a biocombustível completa, foram investigadas diferentes opções para a construção de um bioânodo eficiente que possa ser integrado ao cátodo de GDL-PdNPs/MWCNT.

Baseado no trabalho recente reportado por *Reuilard* e colaboradores⁷³, em que foi realizado o desenvolvimento de um bioânodo – por meio da bifuncionalização de nanotubos de carbono aplicado para a oxidação de glicose, com a imobilização de Glicose Desidrogenase NAD-dependente, coimobilizada com um complexo de Ru(II) ligado a dois ligantes 1,10-fenantrolina-5,6-diona, responsáveis pela regeneração da NAD^+ – foi investigado três diferentes quinonas possíveis para a modificação do bioânodo. Para isso, foram escolhidas como candidatas: a antraquinona 2-sulfonato de sódio (AQS), 9,10-fenantrenoquinona (PQ), 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ) possíveis de serem utilizadas como transporte de elétrons entre o eletrodo e o NADH. Primeiramente, devido as suas estruturas aromáticas ricas em elétrons, foi esperado que estas quinonas pudessem adsorver-se sobre a superfície dos nanotubos de carbono pelas interações π - π e formar uma camada eletroativa estável.

Para a funcionalização dos MWCNT com as respectivas quinonas, os eletrodos modificados com os nanotubos de carbono foram incubados em uma solução da respectiva quinona na concentração de 10 mmol L^{-1} em acetonitrila. A avaliação dos eletrodos modificados foi realizada por experimentos de voltametria cíclica, sendo que os voltamogramas correspondentes para cada uma das três quinonas utilizadas estão apresentados na Figura 29.

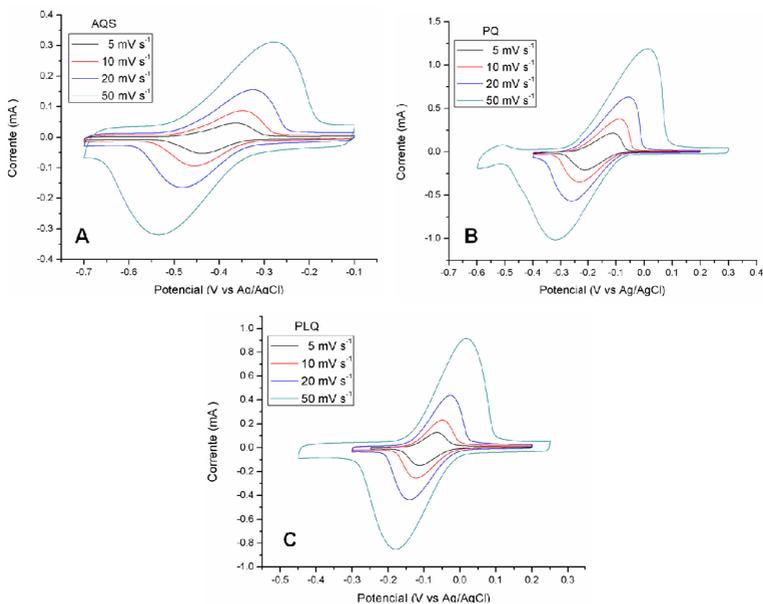
Figura 29. Voltamogramas cíclicos representativos das diferentes quinonas adsorvidas nos eletrodos modificados com os MWCNT em solução tampão de *McIlvaine* (pH 7) com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . AQS (linha), PQ (tracejado) e PLQ (pontilhado).



As três quinonas apresentaram sinais eletroquímicos reversíveis e bem definidos, com os respectivos valores de potencial de meia onda calculados de $E_{1/2} = -0,426 \pm 0,010 \text{ V}$ para antraquinona 2-sulfonato de sódio (AQS), $E_{1/2} = -0,154 \pm 0,014 \text{ V}$ para 9,10-fenantrenoquinona (PQ) e $E_{1/2} = -0,087 \pm 0,006 \text{ V}$ para 1,10-fenantrolina-5,6-diona (PLQ).

Voltametrias cíclicas foram realizadas com diferentes velocidades de varredura para o cálculo da superfície do eletrodo recoberta com as respectivas quinonas imobilizadas (Figura 30 e Anexo A). Para as quinonas não solúveis em água (PQ e PLQ), os valores calculados foram próximos entre si, $\Gamma_{\text{PQ}} = 7,9 \pm 0,3 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ e $\Gamma_{\text{PLQ}} = 6,1 \pm 0,1 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$, enquanto para a AQS, que é solúvel em água, o valor encontrado foi cerca de três vezes menor ($\Gamma_{\text{AQS}} = 2,0 \pm 0,1 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$). Fica evidenciado que as quinonas aromáticas não solúveis em água apresentam maior facilidade em permanecerem adsorvidas de maneira mais eficiente na superfície dos nanotubos de carbono. Isso quando elas são comparadas a AQS que possui um grupo sulfonato, é provável que por esse motivo, parte da AQS adsorvida nos nanotubos de carbono seja perdida na solução da célula eletroquímica.

Figura 30. Voltamogramas cíclicos representativos das diferentes quinonas adsorvidas nos eletrodos modificados com os MWCNT, (A) AQS, B (PQ) e (C) PLQ, em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7) com velocidade de varredura de 5, 10, 20 e 50 mV s^{-1} .



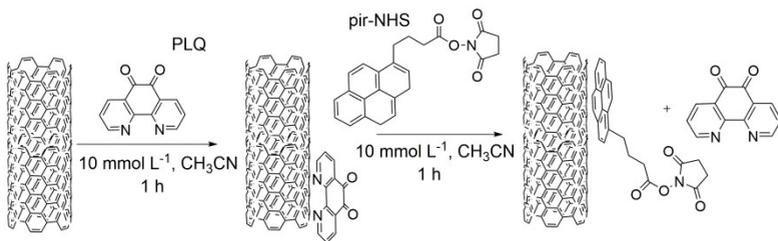
Baseado nos valores de $E_{1/2}$ obtidos anteriormente, a quinona AQS se apresenta como a candidata mais promissora para a aplicação na célula a combustível, pois possibilitaria um aumento da voltagem de circuito aberto (OCV) entorno de 0,350 V, quando comparada às outras quinonas, e, com isso um aumento na potência total da célula híbrida. Porém, os eletrodos modificados com AQS não apresentam nenhuma eletrocatalise para a oxidação de NADH na região de baixo potencial, e além disso, a AQS não apresenta estabilidade, na presença de 2 mmol L^{-1} de NADH na solução, quando há adsorção sobre os nanotubos de carbono. Concluiu-se que esta molécula redox seja tida como inadequada para a construção do bioânodo proposto.

Já, os eletrodos modificados com as quinonas PQ e PLQ apresentaram um aumento na corrente anódica na presença de NADH em solução. Em ambos os casos foi possível observar um decréscimo na corrente catódica, sendo que este decréscimo foi mais evidente para a PLQ (figura 35). Este decréscimo pode ser um indicativo de que a PLQ seja um melhor eletrocatalisador quando comparada com a PQ. Mesmo a PQ

apresentando um valor de $E_{1/2}$ mais favorável para construção da célula a combustível, pelo fato da PLQ apresentar uma maior atividade electrocatalítica que a PQ para a reação de oxidação de NADH, esta foi escolhida para a construção de um bioânodo a base de GDH.

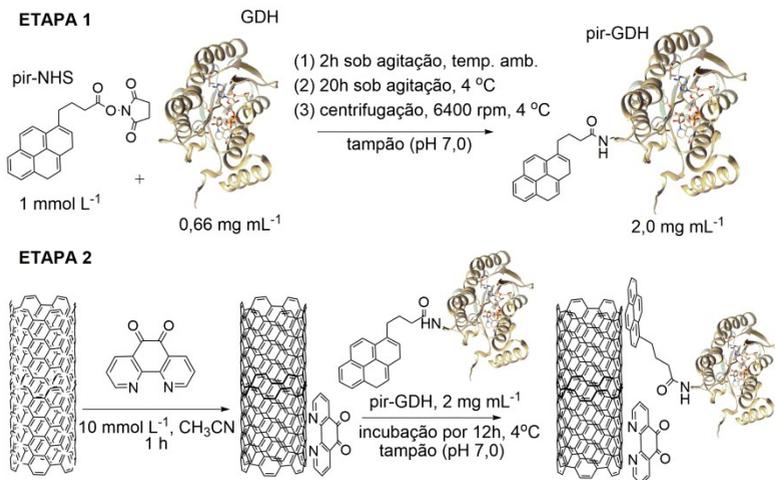
A adsorção da PLQ sobre a rede de nanotubos de carbono na superfície do eletrodo, é apenas parte da construção do bionado sugerido, pois é necessário ainda uma segunda modificação na superfície do eletrodo para a imobilização da enzima GDH. A estratégia estabelecida para a modificação do eletrodo com GDH foi feita por meio da imobilização prévia do ácido *N*-hidroxissuccinimida-1-pireno butírico éster. O que é possível pelas interações π - π (de forma não covalente) entre o grupo pireno e a superfície dos nanotubos de carbono, para ser então submetido ao acoplamento com a GDH, por meio de uma ligação covalente. Entretanto, quando o eletrodo modificado com PLQ foi incubado em solução de pir-NHS em CH_3CN ocorreu um processo de competição referente à adsorção da PLQ e pir-NHS, resultando na diminuição significativa da Γ_{PLQ} (cerca de três vezes) comparada com o valor de Γ_{PLQ} obtido sem a adsorção subsequente de pir-NHS, competição esta representada na Figura 31.

Figura 31. Representação esquemática mostrando a adsorção competitiva pela superfície dos nanotubos de carbono pela PLQ e pir-NHS.



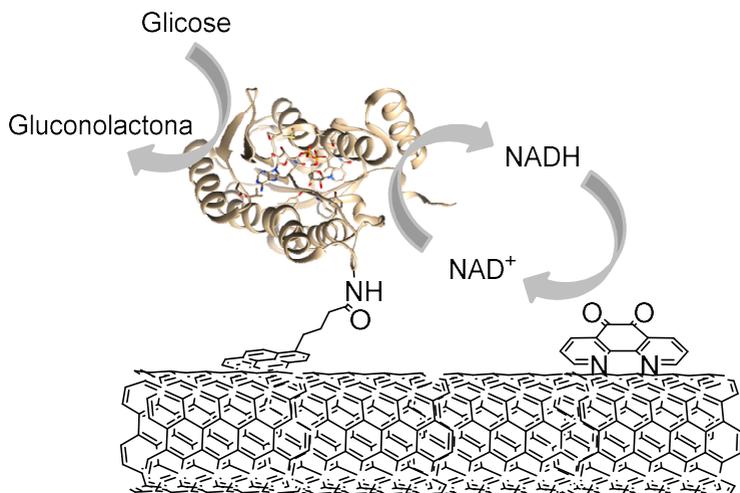
Com o objetivo de contornar essa situação, uma nova estratégia para a imobilização da GDH foi adotada, com o objetivo de manter a PLQ adsorvida sobre a superfície dos nanotubos de carbono quando a enzima GDH for imobilizada. Esta nova estratégia consiste em realizar primeiramente a modificação da GDH com pir-NHS (figura 34, etapa 1), para que a enzima possua um ou mais grupos pirenos em sua superfície, gerando pir-GDH, para subsequente funcionalização dos nanotubos de carbono com PLQ e pir-GDH, conforme Figura 32, etapa 2.

Figura 32. Representação esquemática da modificação da enzima GDH com pir-NHS (etapa 1) e a dupla funcionalização dos nanotubos de carbono com PLQ e pir-GDH (etapa 2).



A dupla funcionalização dos nanotubos de carbono com PLQ e pir-GDH foi realizada de forma sucessiva em solvente orgânico e aquoso, evitando a competição pela adsorção na superfície dos nanotubos, pela diferença de solubilidade da PLQ nos solventes utilizados. Isto possibilitou que as funcionalizações ocorressem como planejado, e com isso possibilitasse a construção do bioânodo, para que acontecesse a oxidação enzimática da glicose através da redução do cofator NAD⁺, em que sua forma reduzida (NADH) é regenerada eletroquimicamente pela PLQ (Figura 33).

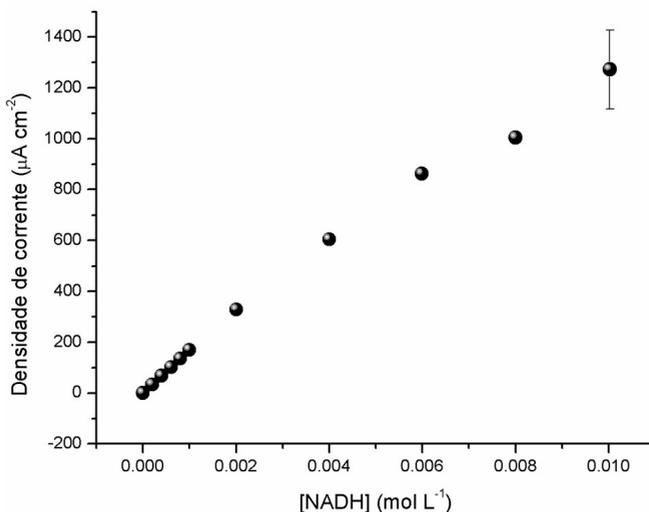
Figura 33. Representação esquemática do eletrodo contendo os nanotubos de carbono bifuncionalizados com PLQ e GDH.



Para a determinação da concentração mínima de NAD^+ suficiente para o bom funcionamento da célula híbrida a biocombustível e os testes com o bioânodo, foi realizado um experimento de cronoamperometria com o eletrodo de MWCNT/PLQ, variando a concentração de NADH no meio (Figura 34). Com isso foi observado que existe uma correlação linear entre a corrente catalítica e a concentração de 0 a 10 mmol L^{-1} de NADH.

No eletrodo de MWCNT/PLQ, a NADH não é considerada como catalisador, apenas como substrato para a sua oxidação, pois não é regenerada no eletrodo. No eletrodo, a NADH é oxidada pela PLQ gerando NAD^+ . No entanto com a GDH immobilizada, NAD^+ é reduzida na presença de glicose para NADH, que é convertida novamente para NAD^+ pela PLQ, podendo ser utilizada novamente pela enzima. Desta forma, pode-se afirmar que mesmo numa baixa concentração do co-fator NAD^+ em solução, é possível que a sua concentração interfacial seja quase constante na presença da enzima GDH.

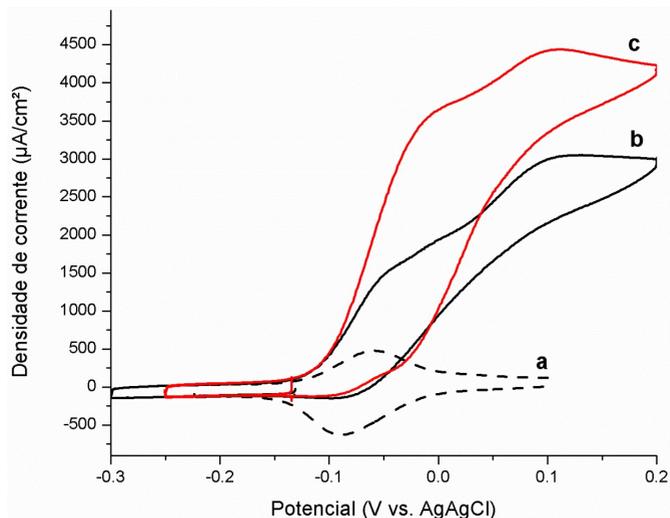
Figura 34. Aumento da densidade de corrente após as subsequentes adições de NADH sobre o eletrodo modificado com PLQ/MWCNTs. Dados obtidos de experimentos de cronoamperometria. O ponto equivalente à concentração de 10 mmol L⁻¹ de NADH representa os experimentos realizados em triplicata, em tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0).



Pode ser verificado através dos voltamogramas cíclicos na figura 35, que na presença de 100 mmol L⁻¹ de glicose e 10 mmol L⁻¹ de NAD⁺, a densidade de corrente catalítica aumentou apenas por um fator de aproximadamente 1,8 em comparação com o voltamograma na presença de 2 mmol L⁻¹. Caso fosse esperado que este aumento fosse linear – como no caso da simples oxidação da NADH pela PLQ –, seria esperado um aumento de aproximadamente 5 vezes.

Após o cátodo de GDL-MWCNT/PdNPs ter sido totalmente caracterizado, foi verificado que este cátodo foi capaz de fornecer cerca de 2 mA cm⁻² a 0.0 V (figura 25). Ao projetar a futura célula a biocombustível, a concentração de 2 mmol L⁻¹ de NAD⁺ foi considerada como mais apropriada, pois é capaz de fornecer cerca de 1,9 mA cm⁻² próximo de 0,0 V, sendo neste caso a célula a biocombustível completa limitada pelo bioânodo. Caso contrário, mesmo em concentrações superiores de NAD⁺, a corrente que passa pela célula a combustível teria sido limitada pela corrente do cátodo. Neste sentido pareceu mais adequado utilizar uma concentração mais baixa de NAD⁺ (2 mmol L⁻¹) durante os testes com o bioânodo e as células a biocombustível.

Figura 35. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com PLQ/pir-GDH/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0), (a) sem adição de glicose (b) com glicose 100 mmol L⁻¹ e NAD⁺ 2 mmol L⁻¹, e (c) com glicose 100 mmol L⁻¹ e NAD⁺ 10 mmol L⁻¹ com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹.

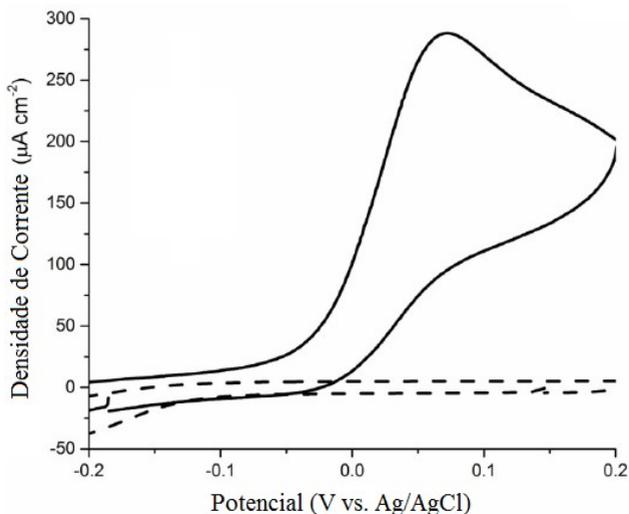


No voltamograma da figura 35, ainda é possível observar que na ausência de glicose no meio, fica evidenciado o sinal eletroquímico reversível bem definido da PLQ. A adição de glicose no meio (100 mmol L⁻¹) provocou o surgimento de um sinal eletroquímico irreversível com o início do processo de oxidação ocorrendo no potencial de -0,15 V, que pode ser atribuído à oxidação da NADH, que por sua vez foi gerada enzimaticamente a partir da oxidação da glicose pela GDH. É possível também observar um segundo processo eletrocatalítico de transferência de massa limitada em torno de 0,1 V que pode ser atribuído a oxidação de NADH pelos nanotubos de carbono, conforme pode ser observado num experimento paralelo, em que a oxidação de NADH foi avaliada em eletrodos que continham nanotubos de carbono não modificados, conforme mostra o voltamograma cíclico na Figura 36.

A oxidação direta de NADH em eletrodos de GC não modificados é conhecido por ser pouco reversível e ocorrer em um alto sobrepotencial, de cerca de 1,1 V sobre carbono e 1.3 V sobre platina,⁸⁵ e consequentemente,

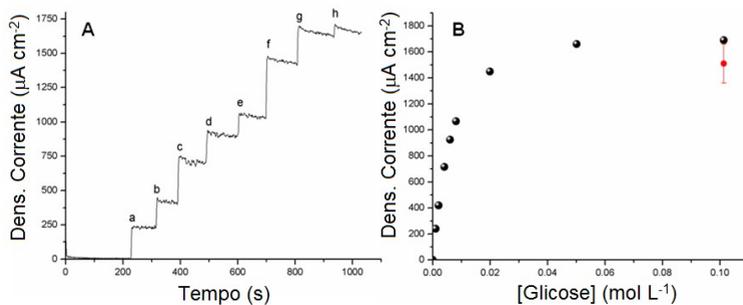
estratégias de modificação de eletrodos no sentido de realizar a oxidação de NADH em potenciais menores são importantes para estratégias de confecção de ânodos.

Figura 36. Voltamogramas cíclicos do eletrodo contendo os MWCNT não modificados, em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0), com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} , sem adição de NADH (linha pontilhada), e na presença de 2 mmol L^{-1} de NADH.



A performance dos eletrodos de MWCNT modificados com PLQ/pir-GDH foi avaliada por meio de medidas de cronoamperometria no potencial relativo ao pico anódico somados 50 mV ($E = E_{\text{pa}} + 50 \text{ mV}$), no valor de $-8 \pm 10 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$, conforme mostra a Figura 37A, através de adições consecutivas de glicose no meio. A corrente electrocatalítica referente ao processo de oxidação da glicose aumentou conforme o aumento da concentração de glicose, atingindo a saturação a partir de 50 mmol L^{-1} de glicose, gerando uma densidade de corrente de $1510 \pm 150 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 100 mmol L^{-1} de glicose (Figura 37B).

Figura 37. (A) Cronoamperometria referente aos eletrodos modificados com PLQ/pir-GDH/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0) contendo NAD^+ 2 mmol L^{-1} , com sucessivas adições de glicose ao meio, nas concentrações de (a) 1, (b) 2, (c) 4, (d) 6, (e) 8, (f) 20, (g) 50 e (h) 100 mmol L^{-1} . (B) Aumento da densidade de corrente catalítica após as subsequentes adições de glicose. Dados obtidos de experimentos de cronoamperometria. O ponto vermelho representa os experimentos realizados em triplicata, em tampão de McIlvaine (pH 7,0) contendo NAD^+ 2 mmol L^{-1} e glicose 100 mmol L^{-1} .

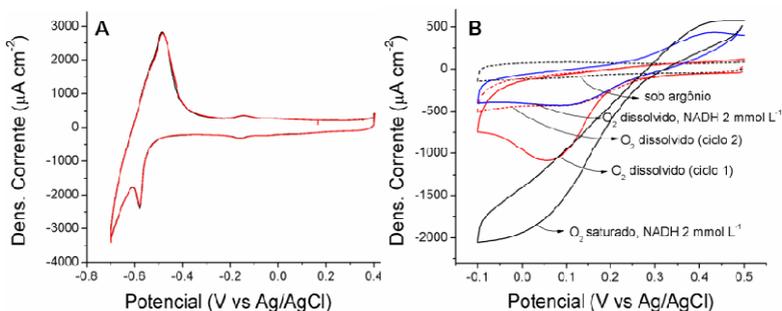


5.8.1. Investigação das possíveis reações paralelas no cátodo

Antes de combinar o bioânodo PLQ/pir-GDH com o catodo PdNP/MWCNT para formar a célula híbrida a biocombustível de glicose/ O_2 completa, foi necessário a investigação de reações paralelas que podem ocorrer no cátodo, como a oxidação de glicose e NADH.

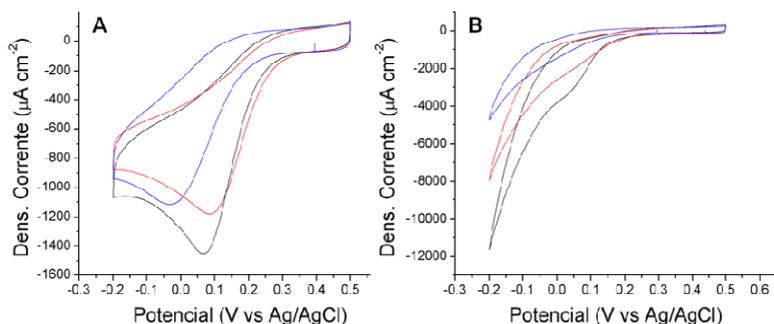
Essa investigação foi realizada por meio de experimentos de voltametria cíclica realizados com os eletrodos modificados com as PdNPs, na presença de 100 mmol L^{-1} de glicose, e 2 mmol L^{-1} de NADH (figura 40). Assim como esperado em pH neutro, nenhuma eletrocatalise relativa a oxidação de glicose foi observada nos eletrodos a base de PdNPs/MWCNT (Figura 38A)). Porém, foi observada a oxidação de NADH no eletrodo modificado com as PdNPs (Figura 38B). Entretanto, a oxidação de NADH ocorreu em potenciais mais elevados (acima de 0,3 V), não apresentando uma forte competição com a redução de oxigênio no eletrodo, confirmando que este eletrodo pode ser combinado com o bioânodo PLQ/pir-GDH para a formação de uma célula híbrida a biocombustível.

Figura 38. Voltamogramas cíclicos de (A) eletrodos a base de PdNPs/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0) (linha preta), e na presença de glicose 50 mmol L⁻¹ (linha vermelha), e (B) eletrodos a base de PdNPs/MWCNT em tampão de McIlvaine (pH 7,0) sob diferentes condições de concentração de oxigênio, e na presença de NADH 2 mmol L⁻¹. Ambos os experimentos realizados com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.



Também foi investigada a influência da presença de NAD⁺ no meio, quando O₂ é reduzido pelo cátodo a base de PdNPs/MWCNT. Experimentos de voltametria cíclica foram realizados com os eletrodos modificados com as PdNPs (GC e GDL) na presença de 50 e 100 mmol L⁻¹ de glicose e na presença e ausência de NAD⁺, 2 mmol L⁻¹ (figura 39).

Figura 39. Voltamogramas cíclicos referente aos eletrodos modificados com PdNPs/MWCNT, em solução tampão *Mcllvaine* (pH 7,0), apenas na presença do tampão (linhas pretas), na presença de glicose (linhas vermelhas), e na presença de glicose e NAD⁺ (linhas azuis). (A) eletrodo de GC modificado, 50 mmol L⁻¹ de Glicose e 2 mmol L⁻¹ de NAD⁺, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, e (B) eletrodo de GDL modificado, 100 mmol L⁻¹ de Glicose e 2 mmol L⁻¹ de NAD⁺, com velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹. Todos os voltamogramas são referentes a segunda varredura.



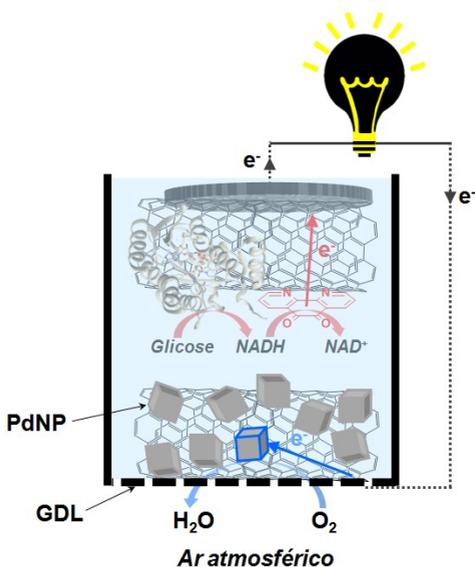
Foi observado que com a presença de glicose no meio, ocorreu uma pequena desativação da capacidade de redução de O₂. Uma vez que não houve nenhuma evidência de oxidação da glicose sob estas condições, esta desativação pode ser atribuída a mudanças referentes à difusão de O₂. Entretanto, notou-se uma desativação significativa quando a NAD⁺ é adicionada ao eletrólito. Quando o experimento foi realizado utilizando os eletrodos modificados à base de GC (figura 41A), as mudanças nos valores de início da redução devido à presença de NAD⁺ foram mais significantes. Dito isso com relação aos valores de corrente absolutos, comparados à notável desativação no momento em que a redução de O₂ é realizada com os eletrodos a base de GDL modificados (figura 41B). Como solução para contornar esse fato e possibilitar o uso dos eletrodos de PdNPs/MWCNT na construção da célula híbrida completa, mesmo na presença de NAD⁺, foi colocada uma membrana entre o bioanodo e o catodo, para evitar a contaminação do eletrodo positivo com o cofator NAD⁺, que demonstrou ter uma forte afinidade pela superfície das PdNPs. Utilizou-se uma membrana de diálise de ester de celulose (MWCO: 100 Da), que permitisse a passagem seletiva da glicose e a retenção do cofator.

5.9. PERFORMANCE DA CÉLULA HÍBRIDA A GLICOSE/O₂

Por fim, foi possível a construção da célula híbrida a combustível de glicose/O₂ completa através da combinação do eletrodo modificado com PdNP/MWCNT, empregado como o catodo e o eletrodo modificado com PLQ/pir-GDH/MWCNT como bioanodo.

Com o objetivo de verificar a validação do uso do catodo de PdNP/MWCNT/GDL, que opera através da redução de O₂ atmosférico, a célula híbrida a biocombustível foi testada sob duas configurações distintas. A primeira configuração foi utilizando o cátodo de PdNP/MWCNT/GDL, que pode operar reduzindo O₂ diretamente da atmosfera e a segunda configuração com o cátodo PdNP/MWCNT/GC, que opera através da redução de O₂ dissolvido em solução. A Figura 40 apresenta uma representação esquemática da célula híbrida completa operando na configuração do modo respirante, que possibilita a redução de O₂ atmosférico.

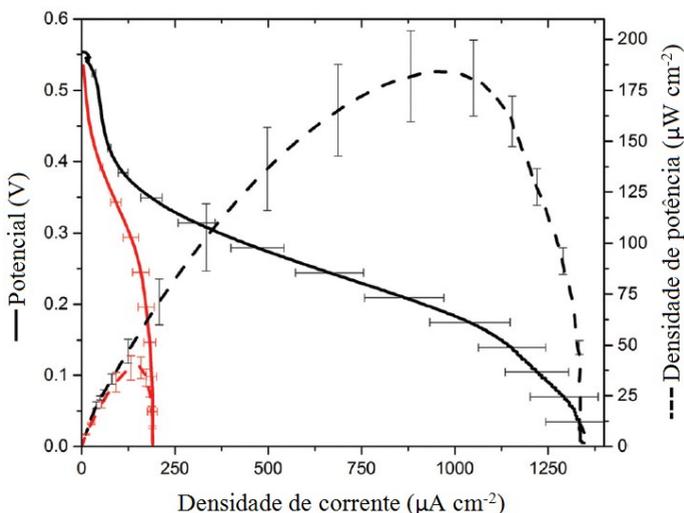
Figura 40. Representação esquemática da célula híbrida a combustível de glicose/O₂, referente à conformação utilizando o catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL combinado com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC, na presença de NAD⁺ e glicose.



A caracterização da célula híbrida a biocombustível foi realizada através de voltametria de varredura linear, a uma baixa velocidade de varredura (1 mV s^{-1}), para a avaliação da performance da célula a combustível sob as duas condições acima citadas.

Foi possível observar que quando a célula híbrida foi testada sob a configuração que permite a redução de oxigênio diretamente da atmosfera, com o cátodo modificado contendo a GDL, sua performance foi efetivamente superior quando comparado à célula híbrida em que o catodo operou sob solução em condição quiescente (Figura 41).

Figura 41. Polarização (linha sólida) e curva de potência (linha tracejada) obtidos do catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL (preto) e catodo PdNP/MWCNT/GC sob condições quiescentes (vermelho). Ambos combinados com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC em uma célula híbrida a biocombustível, na presença de 2 mmol L^{-1} de NAD^+ e 50 mmol L^{-1} de glicose, em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0). A voltametria de varredura linear foi realizada com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} .

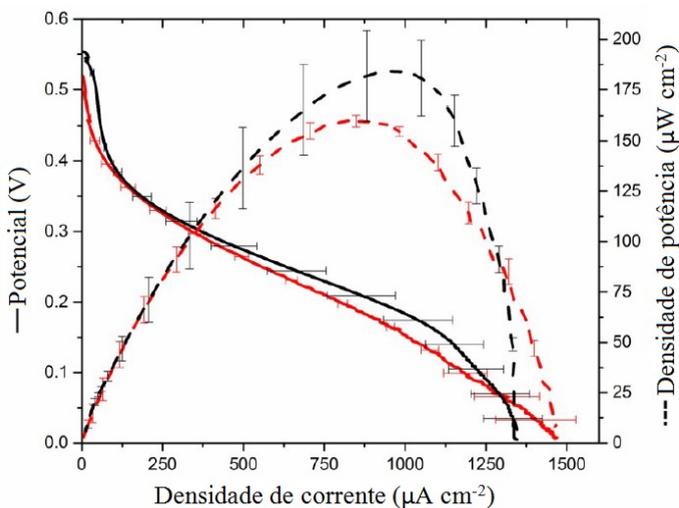


A célula híbrida contendo em sua configuração o cátodo PdNP/MWCNT/GDL, reduzindo O_2 atmosférico, proporcionou uma voltagem de circuito aberto (OCV) de $0,554 \text{ V}$, apresentando uma densidade de corrente máxima de $1345 \pm 85 \mu\text{A cm}^{-2}$ e uma densidade de potência máxima de $184 \pm 21 \mu\text{W cm}^{-2}$ em $0,19\text{V}$, enquanto a célula híbrida com o

catodo PdNP/MWCNT/GC em sua configuração que utiliza um eletrodo regular de carbono vítreo apresentou uma densidade de corrente máxima de $190 \pm 12 \mu\text{A cm}^{-2}$ e uma densidade de potência máxima de $40 \pm 6 \mu\text{W cm}^{-2}$.

Desta forma, ficou demonstrada a superioridade da célula a combustível que opera através da redução de O_2 atmosférico, isto é, sem limitações referentes a difusão/concentração de oxigênio, apresentando um aumento da potência de quase cinco vezes. Este resultado também pôde ser confirmado através do experimento em uma configuração diferente da célula a combustível, em que a solução do eletrólito foi purgada continuamente com oxigênio (Figura 42), utilizando o catodo de PdNP/MWCNT/GC.

Figura 42. Polarização (linha sólida) e curva de potência (linha tracejada) obtidos do catodo respirante PdNP/MWCNT/GDL (preto) e catodo PdNP/MWCNT/GC sob fluxo contínuo de O_2 (vermelho). Ambos combinados com o anodo modificado PLQ/pir-GDH/GC em uma célula a biocombustível, na presença de 2 mmol L^{-1} de NAD^+ e 50 mmol L^{-1} glicose, em solução tampão de *Mcllvaine* (pH 7,0). A voltametria de varredura linear foi realizada com velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} .



Quando comparados os resultados obtidos entre a célula híbrida com o cátodo respirante de PdNP/MWCNT/GDL e a célula híbrida com o cátodo PdNP/MWCNT/GC, utilizando um eletrodo regular de carbono vítreo, mas em condições de saturação de O_2 na solução, ambas as performances foram comparáveis entre si. A configuração utilizando como cátodo um eletrodo

regular de carbono vítreo modificado (PdNP/MWCNT/GC) apresentou uma densidade de corrente máxima de $1460 \pm 135 \mu\text{A cm}^{-2}$ e uma densidade de potência máxima de $161 \pm 2 \mu\text{W cm}^{-2}$. Este experimento demonstra claramente as vantagens do uso do cátodo respirante de PdNPs/MWCNT, no que diz respeito a sua capacidade eletrocatalítica frente a reação de redução de oxigênio e a capacidade em reduzir O_2 atmosférico, que leva a uma redução de custos e maior facilidade operacional da célula a combustível.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a aplicação de nanopartículas cúbicas de paládio na reação de redução de oxigênio por meio de eletrodos de GC e GDL modificados com MWCNT/PdNPs foi avaliada. As PdNPs cúbicas apresentaram, através de sua eficiência como eletrocatalisador para a redução de oxigênio, como um bom candidato para a substituição de eletrocatalisadores convencionais baseados em platina. As nanopartículas cúbicas de menor tamanho (12,1 nm de aresta) foram escolhidas para os testes com a célula a biocombustível, por apresentarem melhor atividade catalítica devido a sua maior área superficial específica.

A célula híbrida a biocombustível de glicose/O₂ no modo respirante, utilizando GDL na confecção do cátodo, apresentou densidade de corrente máxima e densidade de potência máxima satisfatórias. O que nos leva a afirmar sua grande vantagem operacional e de custos, pois há a capacidade de utilizar as PdNPs para a redução de oxigênio atmosférico, não necessitando fonte adicional de O₂.

Ao final, as metas estabelecidas para o trabalho foram atendidas:

- As nanopartículas cúbicas de paládio foram sintetizadas com sucesso. A metodologia sintética utilizada possibilitou a obtenção de nanopartículas com rendimento seletivo para cubos, controle do tamanho final e uma baixa dispersão de tamanho para todas as quatro sínteses realizadas. As caracterizações realizadas foram satisfatórias, coerentes entre si, e demonstraram que as PdNPs apresentaram alta cristalinidade, com uma estrutura cristalina do tipo *fcc*;
- A caracterização do nanocompósito formado pelos MWCNTs e PdNPs, realizada por SEM, demonstrou uma distribuição uniforme e homogênea das nanopartículas pela superfície dos nanotubos de carbono e a caracterização por CV sob distintas velocidades de varredura possibilitou o cálculo da cobertura superficial do eletrodo pelas PdNPs imobilizadas;
- Frente a ORR, as PdNPs imobilizadas em MWCNTs demonstraram eficiência eletrocatalítica, em meios ácidos, neutros e básicos. Para as diferentes quantidades de Pd imobilizadas, a superfície do eletrodo a base de GDL apresentou uma correlação linear entre as densidades de corrente obtidas e um aumento da deposição de paládio e início da redução no potencial de 0,4 V e densidade de corrente de -1,5 mA cm⁻² em

- 0,0 V com uso de eletrodo modificado a base de GDL em pH 6,0;
- A estabilidade temporal dos eletrodos a base de GDL, modificados com MWCNT/PdNPs, mantidos expostos ao ar ou imersos em solução tampão, demonstraram uma boa estabilidade, mantendo sua atividade catalítica em cerca de 40% mesmo após 37 dias. Quando esses foram submetidos a durante 6,6 h de redução contínua de O₂, por sucessivas varreduras de voltametria cíclica, mantiveram sua atividade em cerca de 33% e após 2h em experimento por cronoamperometria, sendo polarizados em 0,0 V, mantiveram sua atividade frente a redução de O₂ em cerca de 66%;
 - Foi realizado o desenvolvimento de um bioânodo enzimático bifuncionalizado com pirGDH e PLQ como mediador redox, que apresentou boa atividade eletrocatalítica frente a reação de oxidação de glicose e através de um processo do tipo MET, a PLQ foi capaz de oxidar a NADH com um potencial de início da oxidação em -0,15 V, apresentando densidade de corrente de $1510 \pm 150 \mu\text{A cm}^{-2}$, em -8 mV na presença de 100 mmol L^{-1} em pH 7,0;
 - A construção de uma célula híbrida a biocombustível de glicose/O₂ completa foi possível através da combinação do cátodo a base de MWCNTs/PdNPs com o bioanodo a base de MWCNT/pirGDH, sendo que na configuração a base de GDL, em que o catodo reduz oxigênio diretamente da atmosfera, além de superar as limitações referentes a difusão de O₂, foi capaz de fornecer uma densidade de corrente máxima de $1345 \pm 85 \mu\text{A cm}^{-2}$, e densidade de potência máxima de $184 \pm 21 \mu\text{W cm}^{-2}$, O que representa um aumento de aproximadamente 5 vezes comparado quando O₂ é reduzido diretamente da solução com uso do catodo modificado a base de GC.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 ANTOLINI, E. Palladium in fuel cell catalysis. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 9, p. 915-931, 2009.
- 2 MANO, N.; SOUKHAREV, V.; HELLER, A. A Laccase-Wiring Redox Hydrogel for Efficient Catalysis of O₂ Electroreduction. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 23, p. 11180-11187, 2006/06/01 2006.
- 3 TSUJIMURA, S. et al. Oxygen reduction reactions of the thermostable bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* on mesoporous carbon-cryogel electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 263-267, 2014.
- 4 LE GOFF, A.; HOLZINGER, M.; COSNIER, S. Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 941-952, 2015.
- 5 REUILLARD, B. et al. One-year stability for a glucose/oxygen biofuel cell combined with pH reactivation of the laccase/carbon nanotube biocathode. **Bioelectrochemistry**, v. 106, Part A, p. 73-76, 2015.
- 6 ERIKSON, H. et al. Recent progress in oxygen reduction electrocatalysis on Pd-based catalysts. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 780, p. 327-336, 2016.
- 7 ZHOU, W. P. et al. Size Effects in Electronic and Catalytic Properties of Unsupported Palladium Nanoparticles in Electrooxidation of Formic Acid. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 27, p. 13393-13398, 2006/07/01 2006.
- 8 MAZUMDER, V.; SUN, S. Oleylamine-Mediated Synthesis of Pd Nanoparticles for Catalytic Formic Acid Oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4588-4589, 2009/04/08 2009.

- 9 ZHAO, Y. et al. Enhanced electrocatalytic oxidation of methanol on Pd/polypyrrole-graphene in alkaline medium. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 1967-1972, 2011.
- 10 GRIGORIEV, S. A. et al. On the possibility of replacement of Pt by Pd in a hydrogen electrode of PEM fuel cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 17, p. 4438-4442, 2007.
- 11 WANG, Q. et al. Well-dispersed palladium nanoparticles on graphene oxide as a non-enzymatic glucose sensor. **RSC Advances**, v. 2, n. 15, p. 6245-6249, 2012.
- 12 CAI, Z.-X. et al. Palladium nanoparticles deposit on multi-walled carbon nanotubes and their catalytic applications for electrooxidation of ethanol and glucose. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 756-762, 2013.
- 13 DAMJANOVIC, A.; BRUSIĆ, V. Oxygen reduction at Pt-Au and Pd-Au alloy electrodes in acid solution. **Electrochimica Acta**, v. 12, n. 9, p. 1171-1184, 1967.
- 14 VRACAR, L. M.; SEPA, D. B.; DAMJANOVIC, A. Palladium Electrode in Oxygen-Saturated Aqueous Solutions: Reduction of Oxygen in the Activation-Controlled Region. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 133, n. 9, p. 1835-1839, September 1, 1986 1986.
- 15 SHAO, M. Palladium-based electrocatalysts for hydrogen oxidation and oxygen reduction reactions. **Journal of Power Sources**, v. 196, n. 5, p. 2433-2444, 2011.
- 16 JIANG, L. et al. Size-Dependent Activity of Palladium Nanoparticles for Oxygen Electroreduction in Alkaline Solutions. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 156, n. 5, p. B643-B649, May 1, 2009 2009.
- 17 ANASTASOPOULOS, A. et al. The Particle Size Dependence of the Oxygen Reduction Reaction for Carbon-Supported Platinum and Palladium. **ChemSusChem**, v. 6, n. 10, p. 1973-1982, 2013.

- 18 XIAO, L. et al. Activating Pd by Morphology Tailoring for Oxygen Reduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 602-608, 2009/01/21 2009.
- 19 ERIKSON, H. et al. Enhanced electrocatalytic activity of cubic Pd nanoparticles towards the oxygen reduction reaction in acid media. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 7, p. 734-737, 2011.
- 20 SHAO, M. et al. Structural dependence of oxygen reduction reaction on palladium nanocrystals. **Chemical Communications**, v. 47, n. 23, p. 6566-6568, 2011.
- 21 LEE, C.-L.; CHIOU, H.-P. Methanol-tolerant Pd nanocubes for catalyzing oxygen reduction reaction in H₂SO₄ electrolyte. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 117-118, p. 204-211, 2012.
- 22 SAFAVI, A. et al. High electrocatalytic effect of palladium nanoparticle arrays electrodeposited on carbon ionic liquid electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 8, p. 1963-1968, 2007.
- 23 LEE, C.-L.; CHIOU, H.-P.; LIU, C.-R. Palladium nanocubes enclosed by (100) planes as electrocatalyst for alkaline oxygen electroreduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 5, p. 3993-3997, 2012.
- 24 ERIKSON, H. et al. Electrochemical reduction of oxygen on palladium nanocubes in acid and alkaline solutions. **Electrochimica Acta**, v. 59, p. 329-335, 2012.
- 25 BARTON, S. C. et al. Electroreduction of O₂ to Water on the “Wired” Laccase Cathode. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 47, p. 11917-11921, 2001/11/01 2001.
- 26 GUPTA, G. et al. Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 3, p. 247-249, 2011.

- 27 JUKK, K. et al. Oxygen reduction on Pd nanoparticle/multi-walled carbon nanotube composites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 666, p. 67-75, 2012.
- 28 ZHENG, J.-S. et al. Effect of carbon nanofiber microstructure on oxygen reduction activity of supported palladium electrocatalyst. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 5, p. 895-900, 2007.
- 29 KAKAEI, K.; GHARIBI, H. Palladium nanoparticle catalysts synthesis on graphene in sodium dodecyl sulfate for oxygen reduction reaction. **Energy**, v. 65, p. 166-171, 2014.
- 30 THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610-7630, 2014.
- 31 AIKEN, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 145, n. 1-2, p. 1-44, 1999.
- 32 SCHMID, G. **Nanoparticles: From Theory to Applications**. Second Edition. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. ISBN 978-3-527-32589-4.
- 33 BÖNNEMANN, H.; RICHARDS, RYAN M. Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2001, n. 10, p. 2455-2480, 2001.
- 34 UMPIERRE, A. P.; DE JESÚS, E.; DUPONT, J. Turnover Numbers and Soluble Metal Nanoparticles. **ChemCatChem**, v. 3, n. 9, p. 1413-1418, 2011.
- 35 ZHANG, J.; NOGUEZ, C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127-150, 2008.

- 36 GENTRY, S. T.; FREDERICKS, S. J.; KRCHNAVEK, R. Controlled Particle Growth of Silver Sols through the Use of Hydroquinone as a Selective Reducing Agent. **Langmuir**, v. 25, n. 5, p. 2613-2621, 2009.
- 37 NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Changing Catalytic Activity during Colloidal Platinum Nanocatalysis Due to Shape Changes: Electron-Transfer Reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 23, p. 7194-7195, 2004/06/01 2004.
- 38 WILEY, B.; SUN, Y.; XIA, Y. Synthesis of Silver Nanostructures with Controlled Shapes and Properties. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 10, p. 1067-1076, 2007/10/01 2007.
- 39 LIM, B. et al. Shape-Controlled Synthesis of Pd Nanocrystals in Aqueous Solutions. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 2, p. 189-200, 2009.
- 40 NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Shape-Dependent Catalytic Activity of Platinum Nanoparticles in Colloidal Solution. **Nano Letters**, v. 4, n. 7, p. 1343-1348, 2004/07/01 2004.
- 41 LONG, R. et al. Surface Facet of Palladium Nanocrystals: A Key Parameter to the Activation of Molecular Oxygen for Organic Catalysis and Cancer Treatment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 8, p. 3200-3207, 2013.
- 42 LASKAR, M.; SKRABALAK, S. E. Decoupling the Geometric Parameters of Shape-Controlled Pd Nanocatalysts. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 4, p. 1120-1128, 2014.
- 43 ZHANG, H. et al. Shape-Controlled Synthesis of Pd Nanocrystals and Their Catalytic Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 8, p. 1783-1794, 2013.
- 44 JIN, M. et al. Palladium Concave Nanocubes with High-Index Facets and Their Enhanced Catalytic Properties. **Angewandte**

Chemie International Edition, v. 50, n. 34, p. 7850-7854, 2011.

45 XIE, S. et al. Catalysis on faceted noble-metal nanocrystals: both shape and size matter. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 142-150, 2013.

46 ALVES, O. L. Cartilha sobre nanotecnologia. **ABDI**, 2011.

47 FENDLER, J. H.; TIAN, Y. Nanoparticles and Nanostructured Films: Current Accomplishments and Future Prospects. In: (Ed.). **Nanoparticles and Nanostructured Films**: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. p.429-461. ISBN 9783527612079.

48 TOSHIMA, N., Ed. **Metal nanoparticles for catalysis**. In: **Liz-Marzán, et al. Nanoscale Materials**. USA, p.70-96ed. 2007.

49 XIA, Y. et al. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 1, p. 60-103, 2009.

50 XIONG, Y.; XIA, Y. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Palladium. **Advanced Materials**, v. 19, n. 20, p. 3385-3391, 2007.

51 PHAN, N. T. S.; VAN DER SLUYS, M.; JONES, C. W. On the Nature of the Active Species in Palladium Catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura Couplings – Homogeneous or Heterogeneous Catalysis, A Critical Review. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 6, p. 609-679, 2006.

52 XIA, X. et al. Recent Developments in Shape-Controlled Synthesis of Silver Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 41, p. 21647-21656, 2012.

53 YU, D.; YAM, V. W.-W. Controlled Synthesis of Monodisperse Silver Nanocubes in Water. **Journal of the**

American Chemical Society, v. 126, n. 41, p. 13200-13201, 2004/10/01 2004.

54 ZHANG, Q. et al. Facile Synthesis of Ag Nanocubes of 30 to 70 nm in Edge Length with CF₃COOAg as a Precursor. **Chemistry – A European Journal**, v. 16, n. 33, p. 10234-10239, 2010.

55 XIA, X. et al. On the role of surface diffusion in determining the shape or morphology of noble-metal nanocrystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6669-6673, 2013.

56 XIA, X. et al. Facile Synthesis of Palladium Right Bipyramids and Their Use as Seeds for Overgrowth and as Catalysts for Formic Acid Oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 42, p. 15706-15709, 2013/10/23 2013.

57 LI, B. et al. Investigation of Size-Dependent Plasmonic and Catalytic Properties of Metallic Nanocrystals Enabled by Size Control with HCl Oxidative Etching. **Small**, v. 8, n. 11, p. 1710-1716, 2012.

58 NANDA, K. K. et al. Higher Surface Energy of Free Nanoparticles. **Physical Review Letters**, v. 91, p. 106102, 2003.

59 VRIES, A. H. M. D. et al. Homeopathic Ligand-Free Palladium as a Catalyst in the Heck Reaction. A Comparison with a Palladacycle. **Organic Letters**, v. 5, n. 18, p. 3285-3288, 2003/09/01 2003.

60 NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Effect of Catalysis on the Stability of Metallic Nanoparticles: Suzuki Reaction Catalyzed by PVP-Palladium Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 27, p. 8340-8347, 2003.

61 STOWELL, C. A.; KORGEL, B. A. Iridium Nanocrystal Synthesis and Surface Coating-Dependent Catalytic Activity. **Nano Letters**, v. 5, n. 7, p. 1203-1207, 2005/07/01 2005.

- 62 KONDO, S. et al. Active Sites for the Oxygen Reduction Reaction on the Low and High Index Planes of Palladium. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 29, p. 12625-12628, 2009/07/23 2009.
- 63 COSNIER, S. et al. Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations. **Journal of Power Sources**, v. 325, p. 252-263, 2016.
- 64 IVANOV, I.; VIDA KOVIĆ-KOCH, T.; SUNDMACHER, K. Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling. **Energies**, v. 3, n. 4, p. 803, 2010.
- 65 COSNIER, S.; LE GOFF, A.; HOLZINGER, M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. **Electrochemistry Communications**, v. 38, p. 19-23, 2014.
- 66 RAMANAVICIUS, A.; RAMANAVICIENE, A. Hemoproteins in Design of Biofuel Cells. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 25-36, 2009.
- 67 NOLL, T.; NOLL, G. Strategies for "wiring" redox-active proteins to electrodes and applications in biosensors, biofuel cells, and nanotechnology. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3564-3576, 2011.
- 68 CINQUIN, P. et al. A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. **PLOS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10476, 2010.
- 69 RUBENWOLF, S. et al. Prolongation of electrode lifetime in biofuel cells by periodic enzyme renewal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 841-849, 2012.
- 70 TASCA, F. et al. Increasing the coulombic efficiency of glucose biofuel cell anodes by combination of redox enzymes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 7, p. 1710-1716, 2010.

- 71 PATOLSKY, F.; WEIZMANN, Y.; WILLNER, I. Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 16, p. 2113-2117, 2004.
- 72 GOODING, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 15, p. 3049-3060, 2005.
- 73 REUILLARD, B.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Non-covalent double functionalization of carbon nanotubes with a NADH oxidation Ru(ii)-based molecular catalyst and a NAD-dependent glucose dehydrogenase. **Chemical Communications**, v. 50, n. 79, p. 11731-11734, 2014.
- 74 HABERMÜLLER, K.; MOSBACH, M.; SCHUHMANN, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6, p. 560-568, 2000.
- 75 LE GOFF, A.; HOLZINGER, M.; COSNIER, S. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. **Analyst**, v. 136, n. 7, p. 1279-1287, 2011.
- 76 SAKAI, H. et al. A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 1, p. 133-138, 2009.
- 77 BLAKEMORE, J. D. et al. Noncovalent Immobilization of Electrocatalysts on Carbon Electrodes for Fuel Production. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 49, p. 18288-18291, 2013/12/11 2013.
- 78 LE GOFF, A. et al. Tris(bispyrene-bipyridine)iron(II): A Supramolecular Bridge for the Biofunctionalization of Carbon Nanotubes via π -Stacking and Pyrene/ β -Cyclodextrin Host-Guest Interactions. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, n. 37, p. 10216-10221, 2011.

- 79 REUILLARD, B. et al. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with boronic acids for the wiring of glycosylated redox enzymes in oxygen-reducing biocathodes. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 16, p. 2228-2232, 2014.
- 80 DE OLIVEIRA, C. C. S.; ANDO, R. A.; CAMARGO, P. H. C. Size-controlled synthesis of silver micro/nanowires as enabled by HCL oxidative etching. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 6, p. 1887-1893, 2013.
- 81 WOOK LEE, Y.; KIM, M.; WOO HAN, S. Shaping Pd nanocatalysts through the control of reaction sequence. **Chemical Communications**, v. 46, n. 9, p. 1535-1537, 2010.
- 82 DOROFEEV, G. A. et al. Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. **Colloid Journal**, v. 74, n. 6, p. 675-685, 2012.
- 83 BULLEN, R. A. et al. Biofuel cells and their development. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2015-2045, 2006.
- 84 JUKK, K. et al. Electroreduction of oxygen on sputter-deposited Pd nanolayers on multi-walled carbon nanotubes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 9, p. 3614-3620, 2013.
- 85 MA, Y. et al. Investigation of Direct Electrooxidation Behavior of NADH at a Chemically Modified Glassy Carbon Electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 162, n. 6, p. H317-H320, January 1, 2015 2015.

8. ANEXOS

Anexo A - Determinação da superfície do eletrodo recoberta com as quinonas imobilizadas.

Figura 43. Gráficos da corrente de pico anódico (I_{pa}) vs. a velocidade de varredura relativo as quinonas (A) AQS ($slope = 5,834$ e $R^2 = 0,9750$), (B) PQ ($slope = 20,832$ e $R^2 = 0,9814$) e (C) PLQ ($slope = 16,299$ e $R^2 = 0,9962$).

